



ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: **CANO MARTÍNEZ, DAVID**

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D345 DOCTORADO EN SEÑALIZACIÓN CELULAR**

DEPARTAMENTO DE: **Biología de Sistemas**

TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 19/07/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de LUIS A. GONZÁLEZ GUIJARRO // .

Sobre el siguiente tema: *IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL² de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): Sobresaliente

Alcalá de Henares, 19 de Julio de 2017

EL PRESIDENTE

Fdo.:

EL SECRETARIO

Fdo.:

EL VOCAL

Fdo.:

Con fecha 24 de julio de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.:

² La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

El presente documento es una copia de la información contenida en el sistema de información de la Universidad de la Costa, y no debe ser utilizado para fines distintos a los autorizados. La información contenida en este documento es confidencial y no debe ser divulgada a terceros sin el consentimiento expreso de la Universidad de la Costa. La Universidad de la Costa se reserva el derecho de modificar o actualizar la información contenida en este documento sin previo aviso. La Universidad de la Costa no se hace responsable de los daños o perjuicios que puedan resultar del uso de esta información.

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de julio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *CANO MARTÍNEZ, DAVID*, el día 19 de julio de 2017, titulada *IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado resuelve otorgar a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 27 julio de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Firmado digitalmente por VELASCO
PEREZ JUAN RAMON - DNI
03087239H
Fecha: 2017.07.28 11:07:02 -06'00'

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: **CANO MARTÍNEZ, DAVID**

Secretario del Tribunal: **JORGE MONSERRAT SANZ.**

Director de Tesis: **LUIS A. GONZÁLEZ GUIJARRO**



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: ☐ soporte electrónico ☐ impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20____



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado en
Señalización celular

IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Tesis Doctoral presentada por
David Cano Martínez

Director de tesis: **Dr. Luis González Guijarro**

El Dr. D. Antonio Jiménez Ruiz, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada: "Identificación de posibles biomarcadores de la enfermedad inflamatoria intestinal", presentada por D. David Cano Martínez, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. Luis González Guijarro en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 19 de Abril de 2017



Fdo.: Dr. D. Antonio Jiménez Ruiz

El Dr. D. Luis González Guijarro, Profesor Titular de Universidad del
Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada: "Identificación de posibles biomarcadores de la
enfermedad inflamatoria intestinal", presentada por D. David Cano Martínez, ha
sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Biología de Sistemas de
la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos legales para
proceder a su defensa pública.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en
Alcalá de Henares a 19 de Abril de 2017



Fdo.: Dr. D. Luis González Guijarro

A todos los que considero mi familia

AGRADECIMIENTOS

El camino, mi camino en la investigación empezó ojeando el programa del Máster de Dianas Terapéuticas, cada módulo, cada asignatura, eran apasionantes y tenía unas ganas increíbles de empezar. Fue el año, académicamente hablando, que más ahondó en mí. Por ello quiero agradecer a todos los profesores que forman parte de la docencia del Máster, desde la directora, M^a José Carmena, hasta la secretaria del departamento, Angélica, que siempre tiene solución a todos los problemas administrativos y es un pilar en el departamento. También me gustaría recalcar la labor docente de Antonio Chiloeches por su capacidad de comunicar, motivar y enseñar su temario correspondiente a la vía de las MAPKs que me hizo interesarme por el tema más allá de lo académico, y cuando esto sucede es que se está haciendo muy bien.

El tiempo pasó rapidísimo y tenía que elegir en que laboratorio realizar las prácticas del Máster, hablé con la mayoría de grupos de investigación ofertados, algunos de ellos se tomaron una especial molestia. Por ello quiero agradecer a Pedro de la Villa por su predisposición a mi posible incorporación, y a Miguel Ángel Albarsán por haberse tomado las molestias de explicarme detenidamente su línea de investigación sobre los efectos del glifosato. Sin embargo, finalmente me decidí por el grupo de investigación que más tarde sería donde realizaría mi Tesis doctoral.

Era un grupo fantástico, lleno de buena gente. Estaba Laura, con quien aprendí a realizar mis primeros experimentos de western blot y a jugar al pádel, una bellísima persona que espero que le vaya muy bien con su doctorado en Alemania; Patri, mi compañera de tesis y amiga, un apoyo en el laboratorio y fuera de él, merece la pena haber hecho el doctorado por haberte conocido; Lola Fernández, alegría en estado puro; Lola Román, has sido un apoyo para mí durante ciertos momentos de mi tesis, y te agradezco que siempre tuvieses la puerta de tu despacho abierta para mí. Gracias Lola por recibirme con los brazos abiertos, me fascinó tu capacidad de trabajo y tu mentalidad férrea para seguir adelante. Borja, amigo, muchas gracias por tu disposición y ayuda incondicional en TODO, una pieza clave en el laboratorio, serás un magnífico IP y además te lo mereces. Tampoco quiero olvidarme de M^a Val a quien considero parte de nuestro laboratorio y que me ayudó con los experimentos de inmunohistoquímica.

Mi tesis se ha podido realizar en parte gracias a una gran persona que me ayudó con mis experimentos de citometría y de quien aprendí mucho. Gracias Jorge por iniciarme

AGRADECIMIENTOS

en el mundo precioso y complejo de la inmunología, y por contagiarme la pasión por la misma.

Tengo también que nombrar a Luis (técnico), Nuria y Arancha por hacerme sentir como en casa. He ganado tres amigos de una calidad humana enorme.

No me puedo olvidar de Eduardo Arilla, siempre presente al otro lado del pasillo y cuya amabilidad me ha hecho sentir muy a gusto.

Quiero agradecer al Dr. Javier Gisbert que ha permitido de manera directa o indirectamente la parcial sustentación económica de esta tesis, y del que me hubiese gustado aprender mucho más porque es un magnífico gastroenterólogo.

Finalmente como en los artículos, quiero agradecer a Luis que me acogiese en su laboratorio con los brazos abiertos. Es un placer tener un director de tesis con una auténtica vocación investigadora. Me has dado la libertad y el apoyo necesarios que me han permitido obtener la valentía y la conciencia de que soy capaz de solventar cualquier reto en el laboratorio. Gracias Luis por enseñarme a analizar los datos detenidamente, por dar valor a cada resultado obtenido, por aportarme tu visión del mundo y tu forma de pensar que me ha posibilitado aprender de ti más allá de lo profesional. Por todo lo que he aprendido y por preocuparte siempre por mí, sin duda has sido el mejor director de tesis que podría tener.

*En un punto y aparte están mi madre M^a Jesús, mi padre Carmelo, mi hermano Sergio y mi novia Lydia. Son excepcionales y cuyo apoyo incondicional ha permitido esta tesis doctoral y **mi felicidad**.*

Hacer un doctorado te cambia la vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS	1
INTRODUCCIÓN	5
I. Estructura y función del intestino delgado y grueso	7
I. 1. Intestino delgado.....	10
I. 1. i. Duodeno	11
I. 1. ii. Yeyuno e íleon	13
I. 2. Intestino grueso.....	13
II. Aspectos generales de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	16
II. 1. Epidemiología.....	16
II. 2. Etiopatogenia	19
II. 2. i. Factores ambientales e iatrogénicos	20
II. 2. ii. Factores genéticos.....	21
II. 2. iii. Factores inmunológicos.....	23
II. 3. Signos y síntomas	24
II. 3. i. Colitis ulcerosa.....	24
II. 3. ii. Enfermedad de Crohn.....	26
II. 3. iii. Manifestaciones extraintestinales.....	28
II. 4. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.....	30
II. 4. i. Evaluación de la actividad inflamatoria	33
II. 4. i. 1. Índices clínicos.....	33
II. 4. i. 2. Índices endoscópicos.....	37
II. 4. i. 3. Índices histológicos.....	39
II. 4. ii. Biomarcadores	39
II. 4. ii. 1. ANCA y ASCA.....	40
II. 4. ii. 2. Proteína C reactiva.....	41

II. 4. ii. 3. Velocidad de sedimentación globular.....	41
II. 4. ii. 4. Biomarcadores fecales.....	41
II. 4. ii. 5. Albúmina	42
II. 5. Mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inflamatoria	42
II. 5. i. Barreras de protección innata	43
II. 5. ii. Respuesta inmune innata.....	44
II. 5. iii. Respuesta inmune adaptativa	46
II. 6. Tratamiento farmacológico de la enfermedad inflamatoria intestinal....	50
III. Modelos experimentales para el estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal	53
III. 1. Inducción mediante el tratamiento con ácido trinitrobenceno sulfónico/etanol	53
III. 2. Inducción mediante el tratamiento con dextrán sulfato sódico	54
IV. Factor inflamatorio de injerto alogénico-1	54
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
CAPÍTULO I	63
Estudio de la eficacia del infliximab sobre el índice de actividad de la colitis experimental. Identificación del AIF-1 como un posible biomarcador de la enfermedad inflamatoria intestinal.	
Artículo I	
Román ID, Cano-Martínez D, Lobo MV, Fernández-Moreno MD, Hernández-Breijo B, Sacristán S, Sanmartín-Salinas P, Monserrat J, Gisbert JP, Guijarro LG. Infliximab therapy reverses the increase of allograft inflammatory factor-1 in serum and colonic mucosa of rats with inflammatory bowel disease. Biomarkers. 2017; 22(2): 133-144.	

CAPÍTULO II	69
Efecto del infliximab en los niveles de albúmina oxidada sérica durante la colitis experimental.	
Artículo II	
Cano-Martínez D, Román ID, T Lobo MV, Pastor O, Moreno-Villena I, Paradela A, Hernández-Breijo B, Fernández-Moreno MD, Monserrat J, Sanmartín-Salinas P, Gisbert JP, Guijarro LG. Effect of Infliximab in oxidised serum albumin levels during experimental colitis. Biomarkers. 2014; 19(8): 693-701.	
CAPÍTULO III.	73
Estudio del papel del AIF-1 en la diferenciación del linfocito T. Identificación del AIF-1 como posible biomarcador de la enfermedad de Crohn.	
Artículo III	
Cano-Martínez D, Monserrat J, Marsal S, Lobo MV, Hernández-Breijo B, Linares PM, Álvarez-Mon M, Gisbert JP, Guijarro LG. Allograft inflammatory factor-1 stimulates Th-1 differentiation: possible involvement in Crohn's Disease. Biomarkers. 2017 (Enviado).	
RESUMEN FINAL.....	77
CONCLUSIONES	85
ANEXO.....	89
Estandarización del HMSA para la evaluación de anticuerpos anti-IFX. Método aplicado en enfermos de Crohn tratados con IFX.	
Artículo IV	
Hernández-Breijo B, Chaparro M, Cano-Martínez D, Guerra I, Iborra M, Cabriada JL, Bujanda L, Taxonera C, García-Sánchez V, Marín-Jiménez I, Barreiro-de Acosta M, Vera I, Martín-Arranz MD, Mesonero F, Sempere L, Gomollón F, Hinojosa J, Gisbert JP, Guijarro LG; PREDICROHN study group from GETECCU. Standardization of the homogeneous mobility shift assay protocol for evaluation of anti-infliximab antibodies. Application of the method to Crohn's disease patients treated with infliximab. Biochem Pharmacol. 2016; 122: 33-41.	
BIBLIOGRAFÍA	93

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AIF-1: factor inflamatorio de injerto alogénico-1.

ANCA: anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos.

ASCA: anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*.

ATI: anticuerpos anti-infliximab.

CD: clúster de diferenciación.

CDAI: índice de actividad de la enfermedad de Crohn.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

CU: colitis ulcerosa.

DSS: dextrán sulfato sódico.

EC: enfermedad de Crohn.

E-cadherina: cadherina epitelial.

EII: enfermedad inflamatoria intestinal.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

FOXP3: proteína *forkhead box P3*.

GWAS: estudio de asociación del genoma completo.

HMSA: *homogeneous mobility shift assay*.

IFX: infliximab.

IFN- γ : interferón *gamma*.

IL: interleucina.

NAC: N-acetil-L-cisteína.

NF-KB: factor nuclear *kappa B*.

NOD: dominio de oligomerización por unión de nucleótidos.

p38: proteína 38.

pp38: proteína 38 fosforilada.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.

PBMC: células mononucleares de sangre periférica.

PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación.

PCR: proteína C reactiva.

PY99: fosforilación de restos de tirosinas en las proteínas.

PRRs: receptores de reconocimiento de patógenos.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*.

VSG: velocidad de sedimentación globular.

INTRODUCCIÓN

I. Estructura y función del intestino delgado y grueso

El sistema digestivo obtiene los nutrientes procedentes de los alimentos para que éstos puedan ser absorbidos e incorporados a nuestro medio interno, y así abastecer las necesidades de las células que componen nuestro organismo. Sin embargo, la luz del tracto gastrointestinal forma parte del medio externo, por lo que está expuesta a microorganismos y agresiones externas, debido a ello, su pared tiene un importante papel protector como barrera.

La pared del intestino, tanto delgado como grueso, de manera general, se divide histológicamente en cuatro capas concéntricas (Figura 1):

- Mucosa: es una estructura que rodea al lumen, espacio interno del intestino, y se subdivide a su vez en:

1) Epitelio: es la capa interna; está formado por células epiteliales unidas herméticamente de manera estrecha que evitan el paso de microorganismos. La función del epitelio es dual, absorbe nutrientes y protege nuestro intestino mediante la secreción de mucinas y péptidos antimicrobianos. Por tanto, la capa epitelial actúa como un filtro selectivo gracias a la unión de las células que la componen. El epitelio presenta diversas uniones intercelulares entre las que cabe destacar: las uniones adherentes cuya función principal es regular la movilidad celular en la renovación del epitelio mediante la E-cadherina (cadherina epitelial) y las cateninas; las uniones estrechas o de oclusión, que sellan entre membranas plasmáticas de células contiguas gracias principalmente a la proteína ocludina; los desmosomas que a través de la cadherina contribuyen a la estabilidad bajo presión, es decir, a la tracción; y las uniones de hendidura ó uniones gap formadas por conexinas que permiten, a modo de canal, la comunicación entre células mediante el paso de sustancias, y además son responsables de la inhibición del crecimiento por contacto. Pero no solo las células que conforman el epitelio presentan uniones célula-célula, sino que éstas están ancladas a la matriz extracelular mediante integrinas que forman las

uniones focales conocidas como hemidesmosomas [Alberts B et al 2014].

2) Lámina propia: se localiza debajo del epitelio y está formada principalmente por tejido conectivo. Además, se encuentra irrigada por vasos sanguíneos y linfáticos cuya función principal es recoger los nutrientes absorbidos por el tubo digestivo y transportar células del sistema inmunitario respectivamente.

3) Capa muscular de la mucosa: conocida también como *muscularis mucosae*, es una delgada capa de músculo liso que ayuda a que toda la superficie del epitelio quede expuesta a la luz intestinal para absorber nutrientes.

- Submucosa: se encuentra entre la *muscularis mucosae* y la capa muscular externa, consta de una densa capa formada por tejido conectivo que presenta vasos sanguíneos, linfáticos y el plexo nervioso de Meissner.
- Capa muscular externa: está situada debajo de la submucosa y se encuentra formada por una capa interna de músculo circular y una capa externa de músculo longitudinal. Está controlada por el plexo de Auerbach y su función es permitir el tránsito del quilo en la dirección adecuada.
- Serosa o adventicia: constituida por tejido conectivo, cuando cubre la región intraperitoneal recibe el nombre de serosa, y adventicia en la región retroperitoneal.

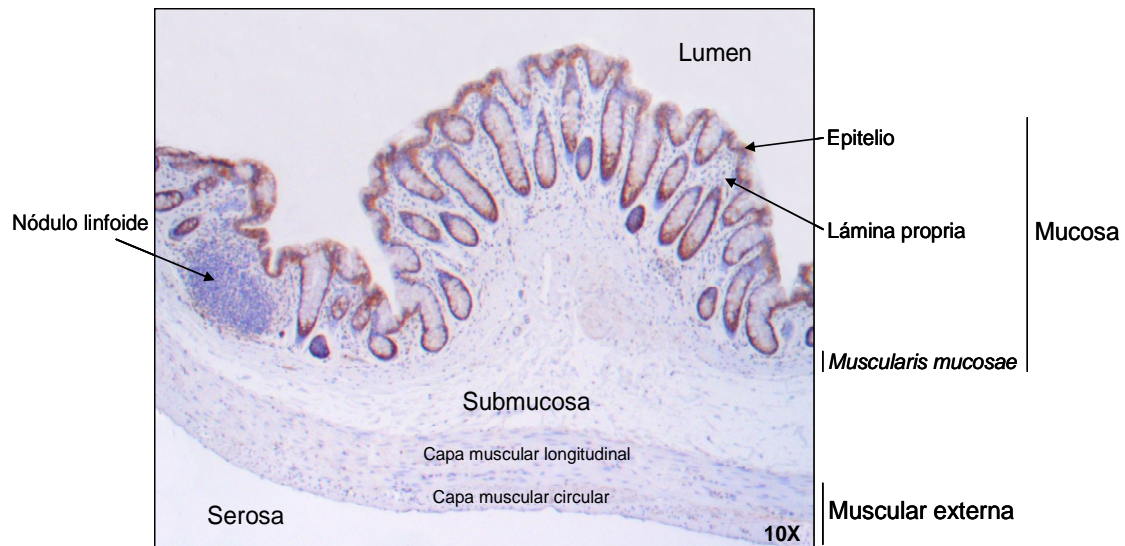


Figura 1. Capas del intestino: mucosa, submucosa, muscular externa y serosa. Corte transversal de colon de rata. Imagen tomada con microscopio óptico (magnificación 10x).

A lo largo del intestino, éste presenta agrupaciones de células inmunes de manera discontinua que forman folículos linfoides y que son claves en la respuesta inmunológica frente a patógenos. A estas estructuras se les conoce como tejido linfoide asociado al tubo digestivo (Figura 1), entre ellas destacan las placas de Peyer. Estas placas están constituidas principalmente por linfocitos B y son abundantes en la lámina propia del íleon [Finke & Meier 2006].

Como hemos visto, la parte interna del tracto intestinal es el epitelio pero este no se halla directamente expuesto a microorganismos o patógenos presentes en el lumen sino que se encuentra cubierto por un fluido, que recibe nombre de moco. El moco está compuesto por glicoproteínas, enzimas e inmunoglobulinas, con la función de proteger el tracto intestinal de bacterias, hongos y virus. Este fluido es secretado por las células caliciformes localizadas en la capa interna del tracto gastrointestinal.

El intestino es regulado de manera paracrina, endocrina, y nerviosa. La respuesta nerviosa es controlada de manera autónoma por el plexo de Meissner y el plexo de Auerbach, ambos plexos forman el Sistema Nervioso Entérico, el cual se encuentra comunicado con el Sistema Nervioso Central a

través del sistema parasimpático y simpático. Las principales hormonas y sustancias reguladoras del intestino son la colecistocinina, la secretina, la somatostatina, el péptido intestinal vasoactivo, la motilina, el péptido YY y el polipéptido inhibidor gástrico.

I. 1. Intestino delgado

El intestino delgado es la parte más larga del aparato digestivo, conecta el estómago con el intestino grueso, desde el píloro (válvula inferior del estómago) hasta la válvula ileocecal (conecta el íleon con el ciego). Se encuentra localizado en el mesogastrio y ocupa prácticamente toda la cavidad abdominal. Tiene una longitud variable, aunque mide entre 7 y 9 metros en una persona adulta normal [Gondolesi et al 2012], y en él se lleva a cabo la parte más importante de la digestión, la absorción de la mayor parte de los nutrientes procedente de los alimentos. Para poder realizar mejor su función, el intestino presenta pliegues, vellosidades y microvellosidades con el fin de aumentar la superficie absorbente del mismo.

Las vellosidades intestinales son pequeñas estructuras en forma de dedos que se proyectan hacia el lumen (Figura 2).

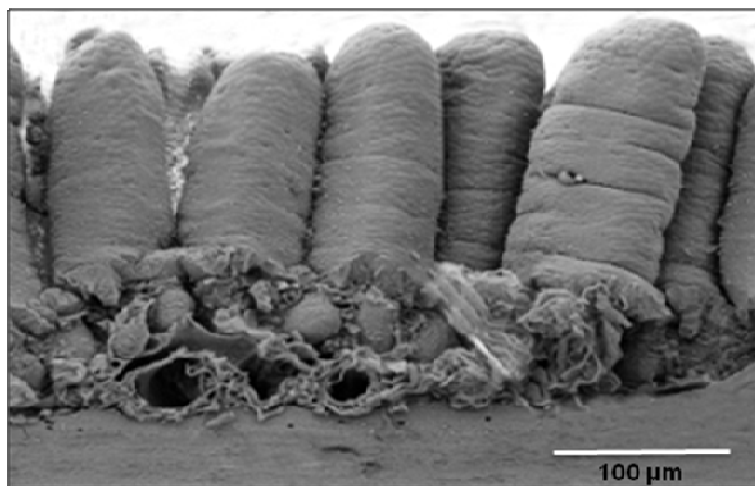


Figura 2. Vellosidades del intestino delgado de una rata. Imagen tomada con microscopía electrónica de barrido. (Adaptada de *Atlas de histología vegetal y animal*, sede Web).

La superficie de las vellosidades está recubierta por células epiteliales especializadas en la absorción y transporte de nutrientes: los enterocitos. Estas células columnares son más abundantes en el intestino delgado (80% de las células) que en el intestino grueso. En su membrana luminal, los enterocitos, presentan microvellosidades (Figura 3) que aumentan aún más la superficie absorptiva del intestino.

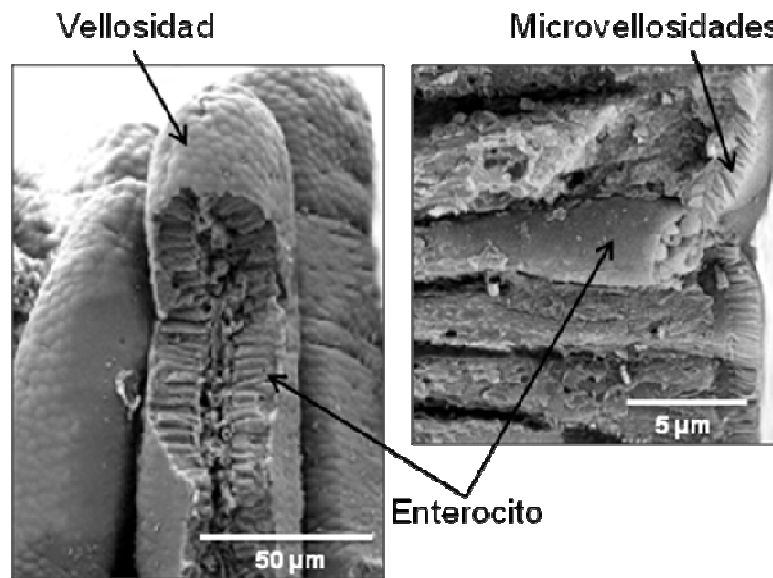


Figura 3. Vellosoidad, enterocitos y microvellosidades del intestino delgado de una rata. Imágenes tomadas con microscopía electrónica de barrido. (Adaptada de *Atlas de histología vegetal y animal*, sede Web).

El intestino delgado está dividido en tres zonas: duodeno, yeyuno e íleon.

I. 1. i. Duodeno

El duodeno es la parte más corta y ancha del intestino delgado, presenta forma de “c”, y se encuentra fijo, anclado en gran parte a la pared posterior del abdomen por el peritoneo. Está formado principalmente por músculo liso y se divide en 4 porciones (Figura 4):

- Porción superior: su longitud es de unos 5 cm y se localiza a la altura de la segunda vértebra lumbar. Esta porción presenta 2 cm iniciales con un

mesenterio móvil denominado bulbo duodenal. El resto del duodeno no es móvil porque es retroperitoneal.

- Porción descendente: se encuentra rodeando la cabeza del páncreas. En él desemboca el conducto colédoco (proveniente del hígado y que contiene la bilis) y el conducto pancreático principal, ambos conductos se unen en forma de ampolla hepatopancreática y se abre en la papila duodenal mayor.
- Porción horizontal: discurre de manera transversal, a la altura de la tercera vértebra lumbar.
- Porción ascendente: se une en su final al yeyuno en la flexura duodenoyeyunal, y se encuentra sostenida por el ligamento de Treitz del músculo suspensorio del duodeno. La contracción de este músculo facilita el movimiento del contenido intestinal.

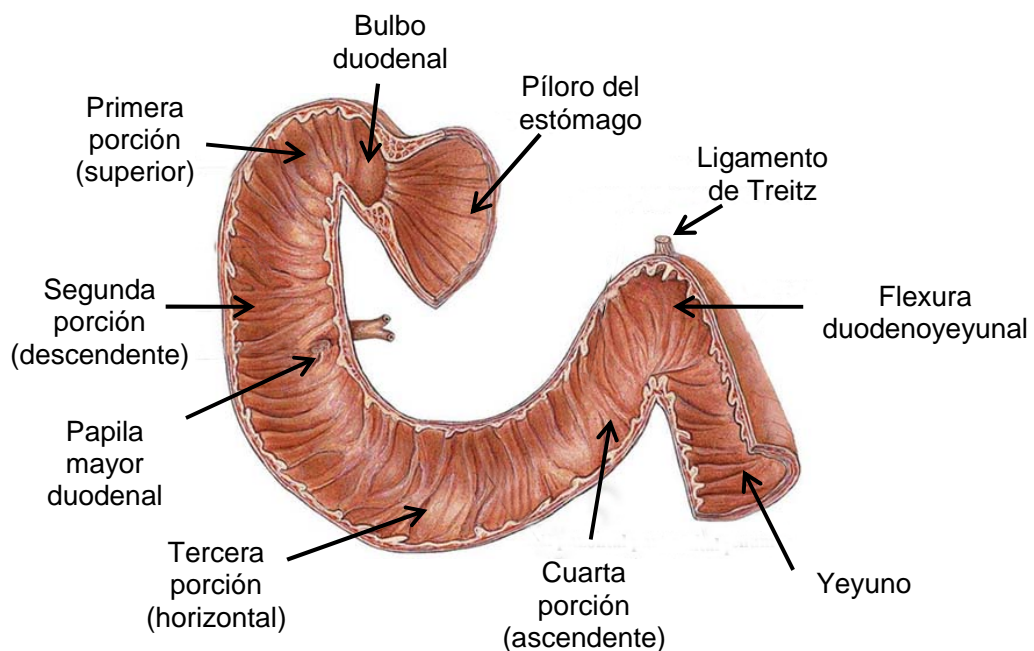


Figura 4. Anatomía del duodeno. Porción superior, descendente, horizontal y ascendente del duodeno.

I. 1. ii. Yeyuno e íleon

El yeyuno comienza en la flexura duodenoyeyunal donde termina el duodeno, recuperándose el curso intraperitoneal del tubo digestivo (Figura 5. Cuadrante superior izquierdo). No hay una zona definida de donde termina el yeyuno y empieza el íleon por lo que se utiliza el término yeyunoíleon, pero si hay rasgos distintivos como el color y la presencia de placas de Peyer. El íleon termina en la unión ileocecal, región donde se une el ciego y el íleon (Figura 5. Cuadrante inferior derecho). La mayor parte del yeyuno se encuentra en el cuadrante superior izquierdo y el íleon en el cuadrante inferior derecho.

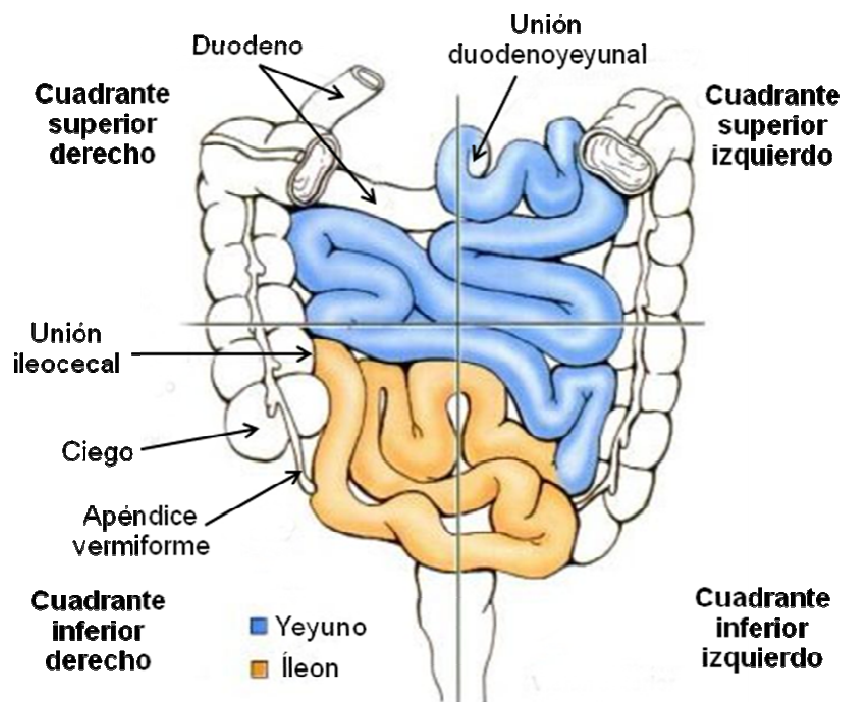


Figura 5. Anatomía del yeyuno e íleon. (Adaptada de Moore et al 2010).

I. 2. Intestino grueso

El intestino grueso, también llamado colon, se encuentra rodeando el intestino delgado en forma de "u" invertida. Se une al intestino delgado (íleon) a través de la válvula ileocecal. La primera parte del intestino grueso tiene forma de saco y se le denomina ciego. El ciego se encuentra adherido a la cavidad

abdominal y presenta una pequeña estructura en forma de gusano llamado apéndice vermiforme, aunque no tiene una función digestiva conocida cumple un papel inmunológico, sirviendo de reservorio de células inmunes. El intestino grueso se extiende desde el ciego hasta la flexura cólica derecha o codo hepático, a este tramo se le conoce como colon ascendente. El segundo tramo del colon cruza el abdomen hasta la flexura izquierda o codo esplénico, denominado colon transversal. A continuación, desciende formando el colon descendente o distal hasta la fosa ílica izquierda. Por último, se encuentra el colon sigmoide o ileopélvico con forma de "s" que termina en el recto y el ano [Standring 2008] (Figura 6).

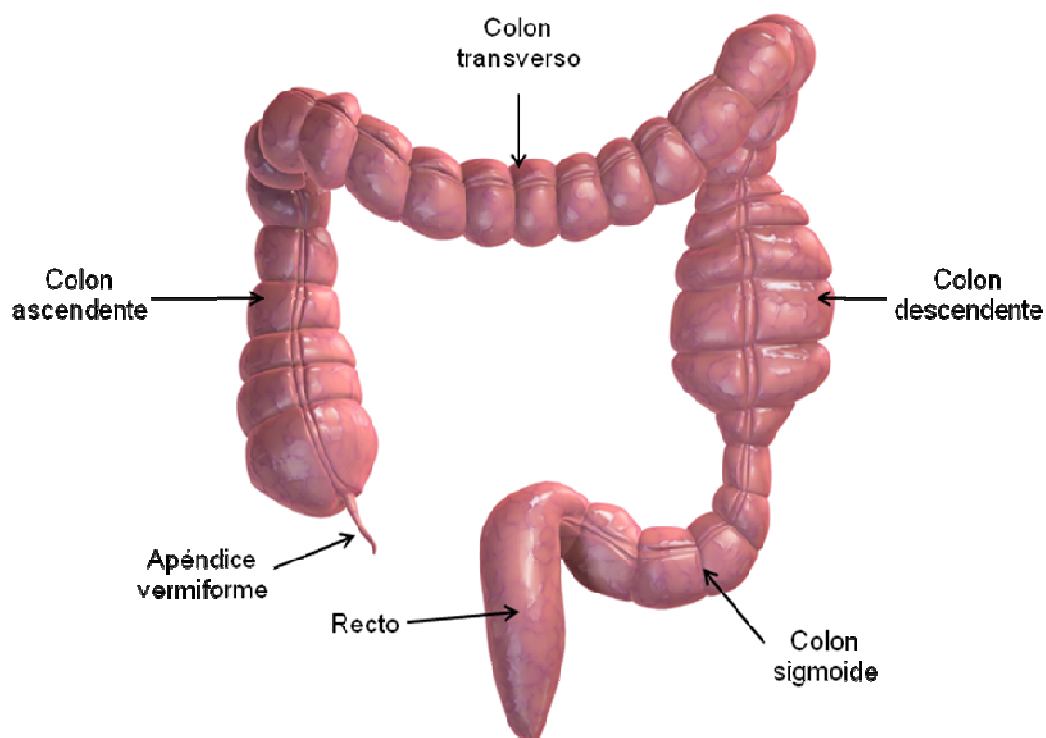


Figura 6. Anatomía del colon. Tramos del intestino grueso: colon ascendente, transversal, descendente, sigma y recto.

Histológicamente el colon no presenta pliegues ni vellosidades. En el colon, el epitelio y la lámina propia se invaginan formando unas glándulas tubulares intestinales llamadas criptas de Lieberkühn (Figura 7). Estas criptas presentan unas células secretoras de moco denominadas células caliciformes. El moco o *mucus* es excretado a la luz intestinal donde cumple una función protectora del

epitelio y también favorece el tránsito de los desechos semisólidos no digeridos. Además, el colon presenta un menor número de enterocitos, ya que la mayor parte de los nutrientes se absorben en el intestino delgado. La función principal del colon es la reabsorción de agua y electrolitos con el fin de deshidratar las sustancias no nutritivas y transformarlas en heces, las cuales son almacenadas en el tramo final del colon hasta su expulsión por el ano. Sin embargo, posee abundantes bacterias que conforman la flora intestinal, encargadas de fermentar residuos que no han podido digerirse previamente, como la celulosa, el almidón resistente, y la lignina entre otros. Las bacterias intestinales son capaces de hidrolizar estos hidratos de carbono resistentes a la digestión de la parte alta del tubo digestivo a través de enzimas bacterianas en ausencia de oxígeno. En este proceso los hidratos de carbono son hidrolizados parcial o totalmente a piruvato a través de la vía metabólica de Embden-Meyerhof. A continuación, el piruvato es reducido a ácidos grasos de cadena corta, principalmente butirato y propionato. Estos ácidos grasos de cadena corta son absorbidos por el colonocito, este hecho lleva asociado una fuerte absorción de sodio y agua, lo que disminuye la diarrea [Musch et al 2001]. Además, el butirato es metabolizado por los colonocitos a dióxido de carbono, cuerpos cetónicos y agua, siendo el butirato la principal fuente de energía de los colonocitos, un estimulante de la producción de mucina [Inan et al 2000] y es capaz de regular la proliferación de las células del colon [Velázquez et al 1996]. Este último hecho ha relacionado a estos hidratos de carbono resistentes con un carácter protector frente al cáncer de colon [Hu et al 2016]. En el intestino grueso hay más de 700 especies de bacterias (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, etc), así como hongos, protozoos y arqueas, que conforma la microbiota de nuestro colon.



Figura 7. Criptas de Lieberkühn de colon de rata. Cortes histológicos teñidos mediante la técnica PAS (ácido periódico de Schiff).

II. Aspectos generales de la enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un proceso inflamatorio crónico del intestino. Estamos ante una enfermedad recurrente, que presenta fases de exacerbación y remisión, es de naturaleza idiopática y actualmente no se dispone de ningún tratamiento curativo. Bajo este nombre se engloban la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). La EC es transmural y puede afectar desde la boca hasta el ano de manera segmentaria. Por otro lado, la CU se caracteriza por ser continua y limitada a la mucosa del colon.

II. 1. Epidemiología

La incidencia y prevalencia de la EII presenta una heterogénea distribución geográfica, siendo más común en países industrializados. La mayor incidencia de la EII, tanto EC y CU, se encuentra en países desarrollados de América del Norte, Europa del Norte [Molodecky et al 2012] [Cosnes et al 2011], Australia [Wilson et al 2010] y Nueva Zelanda [Gearry et al 2010] (Figura 8 y 9). En Europa 1,6 millones de personas padecen EC y 2,1 millones CU, en total 3,7

millones se encuentran afectados por la EII [Burisch et al 2013]. Sin embargo, en Europa del Este su incidencia en la población es menor [Gheorghe et al 2004] [Wiercinska-Drapalo et al 2005]. En África, América Central, y en algunas regiones de América del Sur no hay datos disponibles.

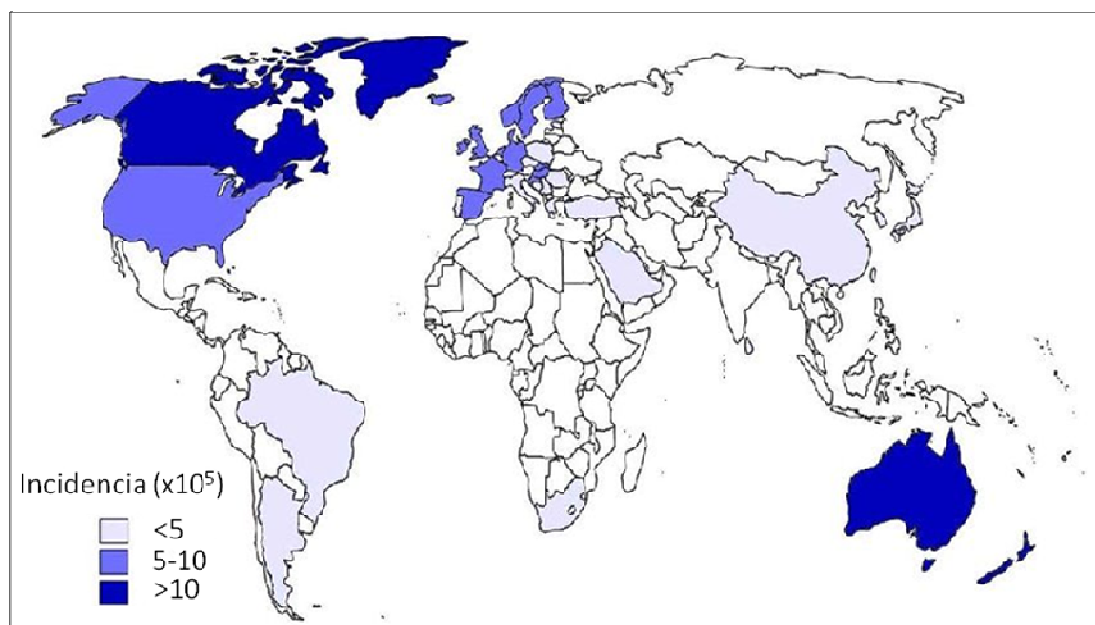


Figura 8. Variaciones regionales a nivel mundial de la incidencia de la EC. (Adaptado de Ng et al 2013).

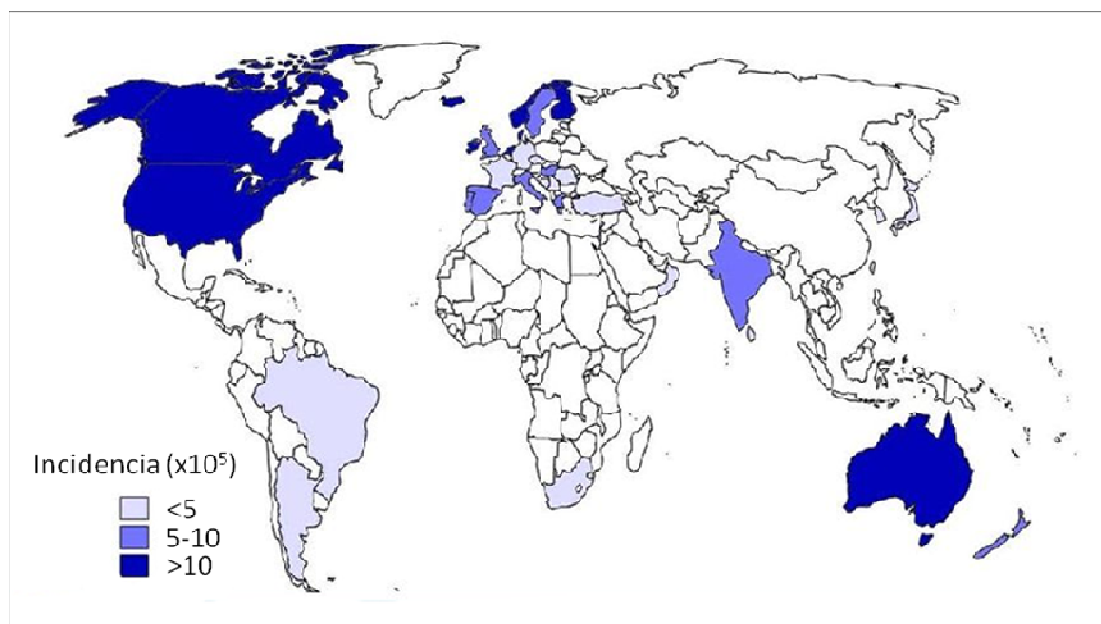


Figura 9. Variaciones regionales a nivel mundial de la incidencia de la CU. (Adaptado de Ng et al 2013).

A pesar de los datos actuales, hay que tener en cuenta que el impacto de la enfermedad sobre la población mundial es dinámico, ocurriendo un cambio epidemiológico con el tiempo y con la geografía, sugiriéndose un mayor peso del factor ambiental en la aparición de la enfermedad. Por ello, en regiones en las que hace unos años presentaban una baja incidencia, en la actualidad se está observando un incremento, como ocurre en Asia [Ng 2014]. Este hecho, que sucede en países que recientemente han obtenido un estatus de país desarrollado, es explicable a la occidentalización del estilo de vida y a la industrialización [Yang et al 2001]. En estos países, la evolución de la enfermedad a nivel poblacional, conlleva un rápido incremento de los casos de pacientes con CU, seguido de un periodo en el que el número de pacientes con CU se mantiene ó disminuye, mientras que aumentan los casos de pacientes con EC [Molodecky et al 2012].

Estudios realizados en diferentes países demuestran una variabilidad geográfica de la incidencia de la enfermedad. Los estudios realizados en países como España, Portugal, Italia [Shivananda et al 1996], Francia [Nerich et al 2006] y Canadá [Green et al 2006], aportan evidencias de la existencia de un gradiente norte-sur de la EII.

Un dato llamativo se encuentra en el aumento de la incidencia de la EII, principalmente CU, de emigrantes en países occidentales respecto a la población nativa. Este hecho posiblemente se debe a la exposición a nuevos factores ambientales, entre ellos cambios en la dieta [Smith et al 2010]. Otro dato destacable es que las zonas rurales presentan menor incidencia de la enfermedad [Soon et al 2012].

En cuanto al sexo, la prevalencia en mujeres es mayor para la EC que en los hombres, sin embargo, los datos en EII muestran una mayor incidencia en hombres [Brullet et al 1998].

Estudios epidemiológicos basados en razas demuestran que la raza blanca presenta una mayor incidencia de la EII que el resto de las razas; en contraste, los asiáticos presentan un porcentaje más bajo. Pero las diferencias raciales,

aparte de la base genética, están también influidas por factores ambientales. No obstante, los judíos ashkenazi tienen una mayor incidencia [*Roth et al 1989*].

La EII en niños se presenta como un caso particular de la misma. Los patrones de localización y progresión de la enfermedad difieren entre niños y pacientes que desarrollaron la enfermedad en edad adulta. En los últimos años, en países occidentales, se ha producido un incremento de la incidencia de la enfermedad en los primeros años de vida, incluida la infancia. Aproximadamente el 25% de pacientes con EII ha tenido síntomas antes de los 18 años [*Farrokhyar et al 2001*]. Un reciente estudio realizado en Ontario, provincia de Canadá, mostró un incremento de pacientes con EII en edad pediátrica en las últimas décadas [*Benchimol et al 2009*]. Aunque la incidencia y prevalencia de la enfermedad en edad pediátrica difiere entre países; la tendencia general muestra un incremento en las últimas décadas. [*Benchimol et al 2011*]. El comienzo de la enfermedad en edad pediátrica hace cobrar una mayor relevancia de los factores genéticos en estos casos.

A pesar de la gran cantidad de estudios que se han realizado en diferentes centros, se encuentra una falta de homogeneidad en la incidencia de países cercanos geográficamente y con hábitos alimenticios similares. Este hecho es explicable debido a los distintos cohortes utilizados en los estudios. Sin embargo, el dinamismo epidemiológico existente nos presenta una oportunidad del estudio de la etiología de la enfermedad.

II. 2. Etiopatogenia

Las causas y el mecanismo por los que se desarrolla la enfermedad todavía no son conocidos. A pesar de ello, los datos epidemiológicos y los estudios derivados de los mismos sugieren una importancia de los factores ambientales, iatrogénicos, genéticos e inmunológicos en el desarrollo de la enfermedad.

II. 2. i. Factores ambientales e iatrogénicos

Como hemos visto en el apartado anterior, se están produciendo cambios en la incidencia de la enfermedad, y por ello se sugiere que los factores ambientales tienen un peso importante en el desarrollo de la enfermedad.

Se han investigado numerosos factores de riesgo, pero hasta ahora no se ha encontrado uno solo que haya sido demostrado como causante de la enfermedad. En la actualidad, se han establecido dos factores de riesgo para la EI: fumar y haber sufrido una apendicectomía.

Diferentes estudios han demostrado que el hecho de fumar aumenta el riesgo de desarrollar EC, con un *odds ratio* de 1.76 [Mahid et al 2006]. Sin embargo, países con alto número de fumadores presentan baja incidencia de la enfermedad como en China [Ng et al 2013], y por contra, en países como Suecia con bajo número de fumadores presentan una elevada proporción [Carlens et al 2010]. En contraste, pacientes con CU presentan un *odds ratio* de 0.58, sugiriendo que el hábito tabáquico dota de un efecto protector frente a la enfermedad [Mahid et al 2006]. Además, pacientes con CU que han abandonado el hábito de fumar presentan mayor diarrea, más ingresos hospitalarios, y en definitiva una peor evolución de la enfermedad.

Los datos de pacientes que han sufrido una apendicectomía demuestran que esta intervención tiene un carácter protector frente a la CU [Andersson et al 2001] [Selby et al 2002]. Este hecho podría ser explicable porque el apéndice es un órgano linfoide con un importante papel en el sistema inmune intestinal. En la EC no está tan clara esta asociación aunque algunos estudios sí la respaldan [Radford-Smith et al 2002].

Otros aspectos que también influyen en el desarrollo de la enfermedad y han sido establecidos como potenciales factores de riesgo son la exposición a nuevos antígenos debido a cambios en la dieta [Hou et al 2011], así como el uso de antibióticos [Card et al 2004] [Hildebrand et al 2008], las costumbres de higiene, la exposición a microbios [Logan & Bowlus 2010] y la polución [Beamish et al 2011]. Hay una controversia respecto a los antiinflamatorios no

esteroideos, algunos estudios lo relacionan como desencadenante de brotes iniciales y recaídas [Bjarnason *et al.* 1987].

Como vemos, hay una amplitud de factores ambientales, quirúrgicos o farmacológicos que pueden afectar o no en el desarrollo de la enfermedad dependiendo del individuo. Esta situación sugiere una diferente susceptibilidad genética. Por lo tanto, la base genética juega un importante papel en el desarrollo de la enfermedad.

I. 2. ii. Factores genéticos

Los factores ambientales no dan una explicación de la distribución geográfica de la enfermedad a nivel mundial, para el desarrollo de la misma debe haber una predisposición genética. Se han realizado distintos estudios que demuestran la importancia de la herencia genética en la predisposición a padecer la enfermedad.

Estudios con gemelos homocigóticos presentan una alta concordancia de EC, alrededor del 50%, superior a la de CU que es de un 12% [Brant 2011], [Tamboli *et al* 2003]. Otro dato de interés, son los estudios realizados en familias con un historial clínico de EII previa, estos sujetos presentan una prevalencia de la enfermedad superior a la media de la población [Orholm *et al* 1991] [Lehtinen *et al* 2011]. Por último, estudios por etnias revelan que la población judía ashkenazi tiene más riesgo de padecer la enfermedad [Roth *et al* 1989].

En las últimas dos décadas el conocimiento del genoma humano completo hace posible el análisis de polimorfismos de un único nucleótido en grandes poblaciones. Estos estudios genéticos son los denominados GWAS (estudios de asociación del genoma completo) que han permitido conocer genes asociados a la EII. Hoy en día, gracias a los estudios de GWAS se han identificado hasta 201 *loci* de susceptibilidad para la EII [Goyette *et al* 2015]. Algunos de estos polimorfismos son propios de la EC y se encuentran principalmente en genes relacionados con la autofagia, respuesta innata y fagocitosis; otros están presentes en pacientes con CU y afectan a genes de la barrera intestinal; también hay polimorfismos comunes a ambas patologías. Los

individuos que presenten alguno de estos polimorfismos tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, aunque rara vez un polimorfismo por sí solo provoca el desarrollo de la enfermedad, este es el caso de una mutación homocigótica del receptor de interleucina 10 que provoca una respuesta inmunológica aberrante desencadenando una CU a edad temprana [Glocker et al 2009].

Los estudios genéticos han permitido identificar nuevos mecanismos patogénicos de la EII, y genes claves en el mantenimiento homeostasis intestinal. Además, algunos de estos polimorfismos dan información sobre el fenotipo de la enfermedad y localización de la misma [Alonso et al 2015]. Entre los genes y *locus* relacionados con la EII cabe destacar:

- NOD2 (dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2): fue el primer gen descubierto implicado en la EII, se le conoce como *loci* IBD1 (enfermedad inflamatoria intestinal 1). Es un receptor citoplasmático de reconocimiento de patrones bacterianos encargado de desencadenar una respuesta inmune por activación de las vías NF-KB (factor nuclear *kappa* B) y MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno), y liberación de citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos [Kufer et al 2006]. Mutaciones en este gen confieren el mayor riesgo relativo de padecer EC en una edad más temprana y con una localización ileal de la enfermedad. [Radford-Smith & Pandeya 2006] [Quaglietta et al 2007].
- ATGL16L1 (proteína relacionada con la autofagia 16-1) e IRGM (proteína guanosina trifosfatasa de la familia M inducible por interferón): son genes implicados en la formación del autofagosoma y el proceso de autofagia necesario para la degradación de componentes celulares incluyendo patógenos. Sus polimorfismos están asociados a susceptibilidad de desarrollar CU y EC [Palomino-Morales et al 2009].
- Receptor de interleucina 23: es un receptor fundamental en la activación de linfocitos Th 17 y por lo tanto en la respuesta adaptativa. Se han identificado polimorfismos de este gen tanto en pacientes con CU como con EC [Wang et al 2009].

- Complejo de antígenos leucocitarios humanos (HLA): es una región del genoma situado en el cromosoma 6 que codifica hasta 225 genes entre los que se encuentran genes relevantes en el sistema inmune tales como el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Se han encontrado, en pacientes con EII, numerosos polimorfismos en distintos genes de esta región, por ello se le ha denominado *locus* IBD3 (enfermedad inflamatoria intestinal 3) [Muro et al 2014].

Como vemos, hay multitud de genes implicados en la enfermedad, y sigue aumentando ese número. Recientemente, se han descubierto nuevos polimorfismos en pacientes con EII localizados en genes relativamente novedosos, como el AIF-1 (factor inflamatorio de injerto alogénico-1) [Juliá et al 2013], abriéndose con el descubrimiento de estos genes, nuevas oportunidades en el estudio del mecanismo por el cual se desencadena la enfermedad, posibles novedosas dianas terapéuticas y/o marcadores biológicos de la misma.

I. 2. iii. Factores inmunológicos

La asociación de la EII con otras enfermedades de carácter autoinmune, la aparición frecuente de manifestaciones extraintestinales, la respuesta a medicamentos inmunomoduladores y los polimorfismos en genes claves de la inmunidad que se asocian con la enfermedad, apoyan la hipótesis de que el sistema inmunitario tiene un papel crítico en la patogénesis de la EII.

La inflamación producida en el intestino debido a la EII presenta una serie de características considerables como predominantes. En pacientes con EC la inflamación está desencadenada por células Th 1, los niveles principalmente de una interleucina (IL), la IL-12, están aumentados en la mucosa de estos pacientes lo que provoca un aumento de interferón *gamma* (IFN- γ) que activa a los macrófagos de manera sostenida [Pallone & Monteleone 1998] provocando lesión tisular por activación de metaloproteasas [Shanahan 2002]. Además, se piensa que los linfocitos de estos pacientes son más resistentes a la apoptosis y por tanto propensos a la autoinmunidad [Boirivant et al 1999]. Por otro lado,

en pacientes con CU, clásicamente se ha descrito como una respuesta inmunológica humoral Th 2 mediada por células B y anticuerpos, en que las citocinas claves en este tipo de respuestas son la IL-4, IL-5 e IL-13. Sin embargo, esta distinción entre CU y EC, en los últimos años, se está volviendo menos estricta, sobre todo desde los recientes hallazgos de la respuesta Th 17 en la EC [Sakuraba *et al* 2009] [Olsen *et al* 2011], en la que IL-23 e IL-17 juegan un papel fundamental [Iwakura & Ishigame 2006]. Independientemente a esta controversia, se produce una activación de las células T y un aumento de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , lo que se ha observado en ambas enfermedades [Komatsu *et al* 2001].

II. 3. Signos y síntomas

La EII es caracterizada por una inflamación crónica del tracto gastrointestinal, suele cursar en forma de brotes y fases de remisión asintomáticas, siendo una inflamación generalmente recidivante. Tanto la CU como la EC se clasifican según criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos. Hay un tercer grupo de pacientes, que padecen una enfermedad que reúne características de las otras dos y que se le denomina colitis indeterminada.

II. 3. i. Colitis ulcerosa

La inflamación afecta a la mucosa del colon, de forma difusa y continua, y no afecta a otros tramos del aparato gastrointestinal. La sintomatología es debida a la inflamación de la mucosa, los síntomas más comunes son diarrea, frecuentemente sanguinolenta y a veces mezclada con moco, tenesmo (sensación de recto ocupado que no se alivia con la defecación), fiebre, y pérdida de peso aunque en menor extensión que en pacientes con EC. La versión más agresiva de la CU se conoce como colitis fulminante y se presenta con síntomas agudos mencionados anteriormente unido a toxicidad sistémica lo que da lugar a taquicardia, anemia, hipoalbuminemia y elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG). Este estado grave puede evolucionar a megacolon tóxico con sepsis y hemorragia masiva, peligrando la vida del paciente, siendo la única vía la resección abdominal por cirugía.

La mortalidad de pacientes con EC es un poco más elevada que en la población general y que en pacientes con CU [Cosnes *et al* 2011]. Sin embargo, pacientes con CU presentan un mayor riesgo de cáncer colorrectal por lo que se les debe realizar una colonoscopia anual.

Según la región afectada del colon, la CU se clasifica en (Figura 10):

- Proctitis: afecta al recto, el límite superior de la región inflamada no supera la región de unión rectosigmoidea.
- Proctosigmoiditis: la inflamación afecta hasta unos 25-30 centímetros del margen anal, es decir, el recto y el sigma.
- Colitis izquierda: afecta al recto, el sigma y el colon descendente.
- Pancolitis: colitis que afecta a la totalidad del colon.

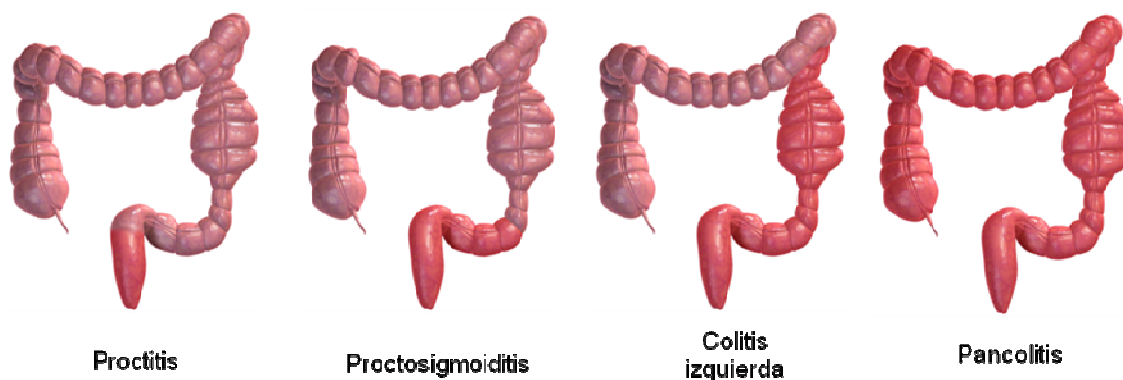


Figura 10. Clasificación de la CU según su localización.

La extensión de la enfermedad nos permite tomar decisiones respecto a la vía de administración del tratamiento farmacológico utilizado. Los pacientes con proctitis suelen ser tratados con supositorios debido a que la zona afectada es de fácil acceso; aquellos que presenten proctosigmoiditis o colitis izquierda lo más recomendable es el uso de enemas; y en aquellos casos con pancolitis es necesario un tratamiento sistémico. También, la extensión de la enfermedad tiene un valor pronóstico, aquellos pacientes con una zona amplia afectada tienen peor curso de la enfermedad con un mayor número de hospitalizaciones,

mayor riesgo de cirugía abdominal resectiva y cáncer colorrectal [Kornbluth & Sachar 2004].

II. 3. ii. Enfermedad de Crohn

Al ser una inflamación segmentaria puede afectar o localizarse en distintas zonas del tracto gastrointestinal, y los síntomas son variables. Afecta a todo el grosor de la pared intestinal desde la mucosa a la serosa, es transmural. De manera general, cursa con dolor abdominal, diarrea, y a veces con sangre. Los fenotipos más agresivos de la enfermedad presentan fístulas o estenosis.

La EC es clínicamente muy heterogénea con una variabilidad fenotípica alta. La clasificación de la EC más extendida es la de Montreal (Tabla 1), basada en la edad de diagnóstico, la localización y el comportamiento de la enfermedad [Silverberg *et al* 2005].

CLASIFICACIÓN DE MONTREAL DE LA ENFERMEDAD DE CROHN		
Edad al diagnóstico	(1) Localización	(2) Patrón evolutivo
A1: ≤ 16 años	L1: ileal	B1: inflamatorio no estenosante y no fistulizante
A2: 17-40 años	L2: cólica	B2: estenosante
A3: > 40 años	L3: ileocólica	B3: fistulizante
(1) Añadir "L4", a L1, L2 o L3 si presenta afección en la zona alta gastrointestinal (2) Añadir "p" a B1, B2 o B3 si existe participación perianal		

Tabla 1. Clasificación de Montreal de la EC. (Adaptada de Silverberg *et al* 2005).

En función de la edad en el momento del diagnóstico, la enfermedad se puede subdividir en tres categorías:

- A1, menores de 16 años.

- A2, entre 17 y 40 años.
- A3, mayores de 41 años.

Los pacientes con una enfermedad precoz, A1, presentan un fenotipo más agresivo de la enfermedad y una mayor predisposición genética.

Respecto a su localización (Figura 11), se considera la zona afectada aquella que presenta úlceras aftoides [Gasche *et al* 2000]. Siguiendo este criterio la EC se clasifica en:

- Localización ileal, L1, siendo la zona afectada el íleon terminal con o sin afección del ciego, sucede en un 30% de los pacientes. Los síntomas se deben principalmente a la estenosis, lo que da lugar a náuseas, vómitos, dolor abdominal en la zona iliaca derecha, fiebre y pérdida de peso. La diarrea es menos severa que en las formas colónicas.
- Localización cólica, L2, la zona afectada se encuentra entre el ciego y el recto, ocurre en un 20% de pacientes. Estos pacientes presentan una fuerte diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso.
- Localización ileocolónica, L3, en esta categoría el íleon terminal y el colon están afectados, sucede en un 40% de pacientes.

Además, si el paciente presenta manifestaciones en boca, faringe, esófago, estómago, duodeno, yeyuno e íleon proximal con o sin afección del distal se le añade "L4", localización gastrointestinal alta, a cualquiera de las situaciones anteriores. Esto sucede en un 5% de los pacientes.

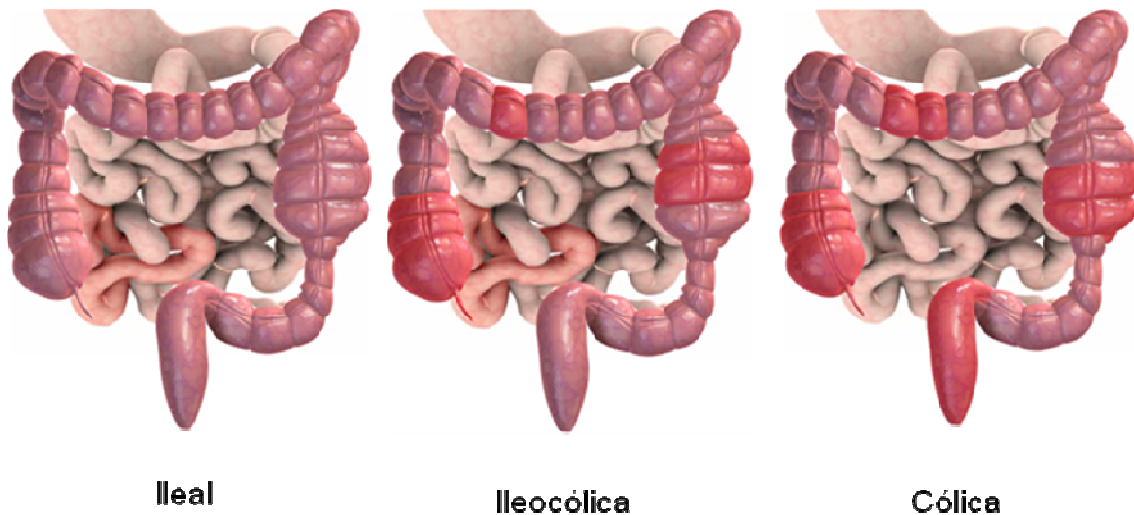


Figura 11. Subclasificación de Montreal de la enfermedad de Crohn. Localización.

En un tercer paso, se valora el comportamiento clínico de la enfermedad pero se hace a lo largo de los años ya que los patrones clínicos varían, por lo que hay que hacer un seguimiento global en el tiempo. De este modo tenemos una subclasificación:

- Patrón inflamatorio no estenosante y no fistulizante, B1.
- Estenosante, B2, caracterizado por vómitos debido a la obstrucción de la luz intestinal.
- Fistulizante, B3, este subgrupo se caracteriza por la presencia de perforaciones locales en el intestino que pueden llegar a órganos vecinos debido al proceso inflamatorio.

Además, si el paciente presenta afección perianal se le añade una “p” (B1p, B2p, B3p).

II. 3. iii. Manifestaciones extraintestinales

La EI no solo afecta de manera intrínseca al tracto gastrointestinal, sino que presenta manifestaciones extraintestinales. Aproximadamente 1/3 de los

pacientes con EII han presentado dichas manifestaciones en algún momento de su vida [Veloso 2011]. Sin embargo, enfermos de Crohn presentan una prevalencia significativamente mayor que en pacientes con CU [Isene et al 2015]. Las manifestaciones extraintestinales pueden involucrar a casi todas las partes del cuerpo, por lo que algunos autores hablan de la EII como una enfermedad sistémica con predominantes manifestaciones intestinales. Las articulaciones, la piel, los ojos y el tracto biliar son algunos de los órganos más comunes implicados en la EII.

Dichas manifestaciones extraintestinales se pueden agrupar según su localización en:

- Cutáneas [Vavricka et al 2015]:

- a. Eritema nodoso: es una lesión en la piel en forma de nódulos rojos inflamatorios de 1 a 5 cm de diámetro presentes en las extremidades, principalmente localizados en el área anterior de la tibia. Aparecen cuando la enfermedad es activa, y el tratamiento es el subyacente de la colitis.
- b. Pioderma gangrenoso: puede aparecer en cualquier zona del cuerpo, y conlleva una necrosis de la piel con úlceras. El tratamiento más usado son los esteroides tópicos.
- c. Lesiones orales en forma de llagas, se dan con mayor frecuencia en pacientes con EC.

- Articulares:

- a. Artritis periférica: este tipo de artritis, a diferencia de otras, no presenta destrucción de las articulaciones, se presenta como una artritis reumatoide seronegativa [Rothfuss et al 2006].
- b. Artritis axial: la más común es la sacroileítis, está presente en un 25% de los pacientes y es diagnosticada de manera

radiográfica, consiste en la inflamación de las articulaciones sacroiliacas. La espondilitis anquilosante es menos común pero está presente entre un 3% y un 5% de pacientes con EII, es una enfermedad autoinmune reumática crónica que conlleva endurecimiento de las articulaciones afectando principalmente a la columna vertebral [*Fornaciari et al 2001*] [*Su et 2002*].

- Oculares: es la tercera manifestación extraintestinal más común por detrás de las artropatías y las manifestaciones cutáneas. Estas manifestaciones oculares se expresan en forma de uveitis y epiescleritis [*Vavricka et al 2015*].
- Hepatobiliares: las enfermedades hepatobiliares tienen una base inmunológica. Sin embargo, muchas de estas alteraciones se pueden atribuir a los tratamientos, ya sean los fármacos o a la nutrición parental. La más común es la colangitis esclerosante primaria, que se caracteriza por la inflamación crónica de los conductos biliares, que conlleva a la formación de lesiones fibrosas en los conductos biliares y obstrucción de los mismos, terminando en cirrosis y fallo hepático [*Ardizzone et al 2008*].
- Óseas: la osteoporosis y la osteopenia son comunes en pacientes con EII pero el riesgo de fractura solo es ligeramente elevado con respecto a la población general. Para su diagnóstico son utilizados marcadores serológicos y técnicas de imagen como el DEXA (absorciometría de rayos X de energía dual) [*Ardizzone et al 2008*].

II. 4. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

Actualmente, no se dispone de ninguna prueba diagnóstica específica de la EII. Sin embargo, se han desarrollado diferentes herramientas metodológicas y técnicas, que permiten realizar un diagnóstico diferencial, caracterizar la enfermedad, clasificarla y monitorizarla. Tanto la CU como la EC quedan definidos por un compendio de criterios clínicos, endoscópicos, histológicos y

radiológicos. A continuación, se detallarán los criterios utilizados en la clínica para el diagnóstico y/o monitorización de la enfermedad:

- Criterios clínicos: se sospecha el inicio de una CU en pacientes con diarrea, presencia de sangre en las deposiciones acompañadas a veces de moco, tenesmo e incontinencia. Puede agravarse, y presentar signos clínicos más severos como palidez, taquicardia y fiebre.

Por otro lado, el comienzo de la EC presenta síntomas como el dolor abdominal y la pérdida de peso en un porcentaje alto de pacientes. La presencia de sangre o moco en las deposiciones es más propia de la EC de tipo cólica. La exploración física puede revelar enfermedad perianal y/o manifestaciones extraintestinales, principalmente cutáneas.

- Criterios hematológicos y bioquímicos: la prevalencia de la anemia en pacientes con EII es una de las complicaciones más comunes [Wilson et al 2004], su patogenia es comúnmente debida a múltiples factores como la malabsorción, la malnutrición y la rectorragia [De la Morena & Gisbert 2008]. La pérdida proteica intestinal que sufren estos pacientes debido a la inflamación intestinal permite detectar altos niveles de α -1 antitripsina y calprotectina fecal. Además, pacientes con un mal pronóstico de la enfermedad presentan niveles bajos de albúmina en sangre [Driscoll & Rosenberg 1978]. Otros parámetros que se relacionan con la actividad inflamatoria son el elevado número de plaquetas en sangre, la VSG y las proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR), la proteína orosomucoide y el factor VIII. Por otro lado, la presencia de ASCA (anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*) y la tinción perinuclear de los ANCA (anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos) son utilizados como marcadores inmunológicos detectados en la EC y la CU respectivamente. Sin embargo, ANCA y ASCA presentan limitada sensibilidad y selectividad por lo que se ha restringido su uso [Mendoza & Abreu 2009]. Además, no permiten valorar el grado de inflamación [Duerr et al 1991].

Estos parámetros enunciados ayudan a diferenciar la EII de otras enfermedades, algunos de ellos han sido incluidos en índices

compuestos usados en la monitorización de pacientes y/o son utilizados en la clínica como marcadores biológicos de la enfermedad, los cuales serán presentados con mayor profundidad en el siguiente apartado.

- Criterios endoscópicos: la endoscopia permite realizar un diagnóstico diferencial entre CU y EC, y a su vez clasificar la misma por su extensión e intensidad. Actualmente es la mejor forma de diagnosticar la enfermedad.

La ileocolonoscopy es un procedimiento habitual en pacientes con CU. Estos enfermos presentan una superficie granular de la mucosa del colon y friabilidad de la misma (la mucosa se rompe con el contacto durante la propia colonoscopia), además pueden presentar hemorragia, ulceraciones y pseudopólipos.

Los enfermos de Crohn presentan zonas discontinuas de afección con fístulas, imagen de empedrado, escasa friabilidad, y estenosis.

- Criterios histológicos: los pacientes con CU presentan una distorsión de las criptas y depleción de las células secretoras de mucina. Además, su histología revela una inflamación continua limitada a la mucosa sin afección transmural [Stange et al 2008]. Por otro lado, los pacientes con EC poseen una inflamación difusa con abscesos, fístulas y agregados linfocitarios [Stange et al 2006].

Aquellos pacientes que presentan características de ambas afecciones se clasifican como colitis indeterminada.

- Criterios radiológicos: las técnicas radiológicas se utilizan en la clínica para confirmar el diagnóstico, evaluar la extensión de la enfermedad y localizar lesiones. Aunque en aquellos pacientes que presentan síntomas graves de la enfermedad, las técnicas de imagen permiten valorar la existencia de obstrucción intestinal, la dilatación del intestino, las complicaciones extraluminales o megacolon tóxico. El tránsito intestinal con bario está indicado para visualizar el intestino delgado en pacientes con EC, y es capaz de detectar fístulas, daños en la mucosa, movimientos peristálticos anormales y permite visualizar la imagen de

empedrado propia de esta patología. Los enemas de bario son poco utilizados por la disponibilidad de la endoscopia, además están contraindicados en pacientes con CU activa. Por otro lado, la TC (tomografía computerizada) y la RM (resonancia magnética) permiten valorar el daño transmural en forma de abscesos y/o fistulas [Ros *et al* 2006]. Otra técnica disponible es la gammagrafía con leucocitos marcados con el radioisótopo indio-111, con el fin de localizar un foco de inflamación o infección oculta.

II. 4. i. Evaluación de la actividad inflamatoria

Como vemos es una enfermedad heterogénea, en la que suelen variar los síntomas con el tiempo, por lo que se han desarrollado numerosos índices de actividad para monitorizar el curso de la enfermedad. Sin embargo, es difícil llevar a la práctica clínica los índices utilizados en los ensayos clínicos porque son complejos, constan de diversos parámetros, lo que limita su uso habitual en la clínica. Aunque estos índices se van simplificando y usando para estandarizar la evaluación de los pacientes y disminuir la subjetividad. A continuación, veremos los más relevantes y cuáles son usados en la práctica clínica.

II. 4. i. 1. Índices clínicos

El Índice de Mayo es el más utilizado en ensayos clínicos de CU. Fue desarrollado por Schroeder y colaboradores en 1987 [Schroeder *et al* 1987] e incluye parámetros como el número de deposiciones, sangre en heces, hallazgos endoscópicos y la evaluación del paciente por parte del médico (Tabla 2). Sin embargo, en la práctica clínica de manera rutinaria es utilizado el Índice de Mayo parcial, sin endoscopia, por la rapidez y simplicidad para valorar el estado del paciente pero tiene grandes inconvenientes como que sólo utiliza parámetros clínicos en los que prima la subjetividad.

ÍNDICE DE MAYO				
Score	Parámetro			
	Frecuencia de deposiciones	Hemorragia rectal	Hallazgos endoscópicos	Evaluación global del médico
0	Normal para el paciente	Ninguna	Normal o enfermedad inactiva	Normal
1	1 o 2 más de lo habitual	Trazas de sangre	Eritema, disminución del patrón vascular, leve friabilidad	Enfermedad leve
2	3 o 4 más de lo habitual	Sangre en la mayoría de las deposiciones	Eritema marcado, ausencia de patrón vascular, friabilidad evidente, erosiones	Enfermedad moderada
3	>5 más de lo habitual	Solo sangre	Hemorragia espontanea, ulceración	Enfermedad grave

Tabla 2. Índice de Mayo. Se considera enfermedad leve un índice de Mayo entre 3 y 5 puntos; se considera enfermedad moderada un índice de 6 a 10 puntos; se considera enfermedad grave un índice >10 puntos. (Adaptada de Rutgeerts et al 2005).

Uno de los primeros índices descritos y que todavía está vigente es el de Truelove y Witts. Este índice consta de parámetros clínicos y analíticos como el número de deposiciones, sangre en heces, taquicardia, fiebre, VSG y hemoglobina (Tabla 3). Diferencia entre enfermedad inactiva y activa, subcategorizando a esta última en leve, moderada y grave [Truelove & Witts 1955]. Pero debido a su complejidad y el tiempo invertido en su determinación, es difícil llevarlo a la práctica clínica.

ÍNDICE DE TRUELOVE-VITTS							
Score	Parámetro						
	Número de deposiciones /día	Sangre en heces	Temperatura (°C)	Frecuencia cardíaca (lpm)	Hemoglobina (g/dl)		VSG (mm/h)
					Hombre	Mujer	
1	<4	No	<37	<80	>14	>12	<20
2	4-6	Escasa	37-37,5	80-90	10-14	9-12	20-30
3	>6	Abundante	>37,5	>90	<10	<9	>30

Tabla 3. Índice de actividad de la colitis ulcerosa de Truelove-Witts. Enfermedad inactiva: 6 puntos; enfermedad leve: 7-10 puntos; enfermedad moderada: 11-14 puntos; enfermedad grave: >16 puntos. (Adaptada de *Truelove & Witts 1955*).

Otros índices, como el de Rachmilewitz o de Seo presentan variables clínicas y analíticas [*Rachmilewitz 1989*] [*Seo et al 1992*], son índices que pretenden ser cuantitativos pero todavía no han sido validados.

Por otro lado, el índice CDAI (índice de actividad de la enfermedad de Crohn), es el más antiguo, data de 1976, desarrollado por Best y colaboradores [*Best et al 1976*]. Actualmente, es considerado un estándar en la valoración de pacientes con EC y evaluación de la respuesta al tratamiento. Este índice considera siete variables clínicas y los niveles de hematocrito (Tabla 4). A pesar de ser de los índices más usados, utiliza variables subjetivas como el dolor abdominal y la valoración del estado general por el clínico, esto le dota de una baja reproducibilidad interobservador [*de Dombal & Softley 1987*]. Además, es necesario 7 días para valorar al paciente.

ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD DE CROHN		
Parámetro	Puntos	Factor
Número de heces líquidas o blandas	Cada día por siete días	x2
Dolor abdominal	Suma de 7 evaluaciones diarias (no= 0, leve= 1, moderado= 2, grave= 3)	x5
Estado general	Suma de 7 evaluaciones diarias (bueno= 0, regular= 1, malo= 2, muy malo= 3, terrible= 4)	x7
Número de manifestaciones clínicas	Artritis o artralgia; iritis o uveítis; eritema nodoso, pioderma o aftas; fisura o fístula anal; fístula en otra localización; fiebre superior a 37,8 °C	x20
Uso de antidiarreicos	No= 0; si=1	X30
Masa abdominal	No= 0; dudosa= 2; si= 5	x10
Hematocrito	Diferencia del hematocrito respecto al normal (47% en hombres, 43% en mujeres)	x6
Peso corporal	Porcentaje de desviación respecto al peso estándar	x1

Tabla 4. Índice de actividad de la enfermedad de Crohn. Para la inclusión en ensayos clínico, se consideran activos los pacientes con un CDAI \geq 220; se considera paciente en remisión un CDAI $<$ 150; se considera respuesta una disminución en el CDAI \geq 100; se considera recidiva un CDAI $>$ 150 con un incremento de 100 puntos respecto al valor basal. (Adaptado de *Best et al 1976*).

El índice de Harvey-Bradshaw (Tabla 5), es un índice simplificado del CDAI, más práctico y rápido ya que en 24 horas se obtienen los resultados. Además, este índice presenta una buena correlación con el CDAI [*Harvey & Bradshaw 1980*].

ÍNDICE DE HARVEY-BRADSHAW					
Score	Parámetro				
	Estado general	Dolor abdominal	Número de deposiciones líquidas diarias	Masa abdominal	Otros síntomas asociados (un punto por cada complicación)
0	Muy bueno	No	Un punto por cada deposición líquida	No	<ul style="list-style-type: none"> • Artralgia • Uveítis • Eritema nodoso • Úlceras aftosas • Pioderma gangrenoso • Fisura anal • Nuevas fístulas • Abscesos
1	Regular	Ligero		Dudoso	
2	Malo	Moderado		Definida	
3	Muy malo	Intenso		Definida y dolorosa	
4	Terrible	-		-	

Tabla 5. Índice de Harvey-Bradshaw para la EC. El índice se calcula sumando los puntos. Se considera paciente en remisión con un índice <5; se considera enfermedad leve con un índice entre 5-7; se considera enfermedad moderada un índice entre 8-16; se considera enfermedad severa un índice >16. (Adaptada de *Harvey & Bradshaw 1980*).

II. 4. i. 2. Índices endoscópicos

Hoy en día, ha cobrado vital importancia la curación/cicatrización de la mucosa frente a la mejoría clínica, llegándose a considerar el *gold standard* en el diagnóstico y seguimiento de la EII. La curación de la mucosa está correlacionada en la clínica con una remisión de los síntomas, un menor número de recaídas [*D'Haens et al 1999*], y menor proporción de la hospitalización e intervención quirúrgica del paciente [*Frosliet et al 2007*]. Se define como la ausencia completa de toda inflamación, de las lesiones ulcerativas, del eritema persistente y de la friabilidad a la endoscopia [*Mazzuoli et al 2013*].

La endoscopia, principalmente la colonoscopia, abarca el examen por parte del clínico del intestino grueso en su totalidad y el íleon, es utilizada para el diagnóstico diferencial entre CU y EC, predecir el curso de la enfermedad, así como para la toma de biopsias y la monitorización del riesgo de padecer cáncer de colon [Fefferman & Farrell 2005]. Actualmente, existen modernas técnicas como el endomicroscopio láser confocal y la cromoendoscopia que permiten valorar con un mayor detalle la mucosa [Buchner & Lichtenstein 2016].

El índice endoscópico más usado en ensayos clínicos para determinar la actividad endoscópica en pacientes con CU es la subescala endoscópica del Índice Mayo (Tabla 2). El rango de puntuación está entre 0 y 3, considerando inactiva la enfermedad con un valor de 0, y aumentando el valor según los hallazgos endoscópicos encontrados como el eritema, patrón vascular, friabilidad, y úlceras, clasificándola en normal, leve, moderada y severa enfermedad. Este valor está limitado porque no distingue entre úlcera profunda y superficial. En relación a esto último, recientemente, ha surgido el índice UCEIS (índice endoscópico de severidad de la colitis ulcerosa), que tiene en cuenta 3 variables: patrón vascular, sangrado, y erosiones y úlceras, distinguiendo las úlceras en superficiales o profundas [Travis et al 2012].

Por otro lado, el primer score endoscópico utilizado para la determinación de las lesiones ileocolónicas en pacientes con EC es el CDEIS (índice endoscópico de severidad de la enfermedad de Crohn). Desarrollado por el GETAID (*Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affectons Inflammatoires Digestives*) [Mary & Modigliani 1989], el índice CDEIS valora distintos hallazgos en 5 segmentos en un rango de 0 a 44. Más tarde, Daperno y colaboradores desarrollo el índice simplificado SES-CD (índice simplificado de la actividad endoscópica de la enfermedad de Crohn) [Daperno et al 2004]. El rango de valoración de este último índice es de 0 a 60 y se valora la superficie intestinal afectada por úlceras, otras lesiones superficiales, presencia de úlceras y estrechamiento de la luz intestinal, cada variable es examinada en 5 segmentos del intestino: íleon terminal, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y sigmoideo, y recto.

Rutgeert's y colaboradores publicó en 1990 un índice endoscópico, el índice de Rutgeert's [Rutgeerts *et al* 1990]. Este índice se ha convertido en el mejor para predecir la recurrencia postoperatoria [Rutgeerts *et al* 1984]. A pesar de las ventajas de estos índices en la evaluación de la gravedad de la EII, dichos índices no valoran el daño transmural, se limitan a la mucosa, y no tienen en cuenta la evolución con el tiempo del daño penetrante. En los últimos años ha surgido una nueva idea "el daño acumulativo intestinal", este concepto ha sido incorporado al índice de Lemann [Pariente *et al* 2011], el cual permite medir y evaluar el daño acumulativo en pacientes con EC. Este novedoso índice tiene en cuenta lesiones fistulizantes, estenosis, y cirugías en distintas regiones.

II. 4. i. 3. Índices histológicos

Los índices histológicos son utilizados en el contexto de los ensayos clínicos, sirven para valorar la actividad histológica de la mucosa intestinal en respuesta a fármacos. Los elementos diagnósticos valorados son principalmente: la morfología de la cripta (ramificación, distorsión, decrecimiento de la densidad de las criptas) y la celularidad de la lamina propria (plasmocitosis basal y granulomas) [Stange *et al* 2006] [Stange *et al* 2008]. Las anomalías en el colon, la depleción de mucina y los abscesos en las criptas, son más propios de la CU, mientras que los granulomas están presentes en enfermos de Crohn. El incremento de células y la plasmocitosis basal es común a ambas patologías [Geboes & Dalle 2002]. Aunque no hay un criterio estandarizado para la respuesta histológica, la plasmocitosis basal en un paciente con CU quiescente se ha asociado a una temprana recaída de la enfermedad [Bitton *et al* 2001].

II. 4. ii. Biomarcadores

Los índices clínicos mencionados anteriormente, utilizados en la práctica clínica, están basados en la sintomatología de la enfermedad. Se ha demostrado una mala correlación entre síntomas clínicos y la curación de la zona afectada. Debido a la dificultad de la evaluación de los síntomas clínicos surge la necesidad de la búsqueda de marcadores biológicos fácilmente cuantificables. Los biomarcadores son utilizados en la práctica clínica para la

toma de decisiones. El término biomarcador fue definido y publicado por el “*National Institute of Health Biomarkers Definition Working Group*” como una característica que es objetivamente medible y evaluable, como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patogénico, una respuesta farmacológica, o una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden aportar información útil en 4 situaciones:

- 1) Diagnóstico diferencial entre CU y EC.
- 2) Prognosis de la severidad de la EII o del comportamiento futuro de la enfermedad para una mejor y temprana decisión del tratamiento.
- 3) Evaluación de la actividad de la enfermedad en el curso de la misma.
- 4) Predecir recaídas.

Un marcador ideal tiene que tener una buena correlación con la actividad inflamatoria, ser rápida su realización, tener bajo coste y no ser invasivo. A continuación, se nombran y describen los marcadores biológicos más destacados en la EII.

II. 4. ii. 1. ANCA y ASCA

En la EII se producen alteraciones inmunológicas que repercuten en cambios de la inmunidad humoral, en este sentido cobran interés los anticuerpos generados en el suero de pacientes con EII. Los ANCA son del tipo IgG y se generan contra antígenos presentes en los gránulos de los neutrófilos. Estos anticuerpos están presentes en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, sin embargo en pacientes con CU, mediante inmunofluorescencia, se observa una tinción perinuclear. El 60% de pacientes con CU son positivos para la tinción perinuclear de ANCA y el 20% de pacientes con EC. ANCA presenta una baja sensibilidad y selectividad, al igual que ocurre con los ASCA [Peeters et al 2001].

II. 4. ii. 2. La proteína C reactiva

La PCR es generada por los hepatocitos [Vermie et al 2006]. Los niveles séricos de PCR aumentan con la inflamación, hasta unas 100 veces por encima de los niveles basales, y baja con la resolución de la misma [Fengming & Jianbing 2014]. Su vida media es de 19 horas lo que la hace interesante para valorar la enfermedad en la fase aguda, su determinación es rápida y barata, pero no es específico de la inflamación intestinal, por ello, se asocia a otros biomarcadores de inflamación como la VSG, trombocitosis, anemia e hipoalbuminemia [Chang et al 2015]. La PCR presenta una mayor correlación con la enfermedad en pacientes con EC que con CU, posiblemente porque la primera es transmural con mayor repercusión sistémica [Vermeire et al 2004].

Otras proteínas de fase aguda como la orosomucoide, el fibrinógeno y la α -1 antitripsina no se han llevado a la práctica clínica porque no mejoran la capacidad predictiva de la PCR.

II. 4. ii. 3. Velocidad de sedimentación globular

Este parámetro cuantifica la velocidad con la que los hematíes sedimentan en un tubo capilar. Las proteínas de fase aguda liberadas en una inflamación aumentan la VSG, aunque también depende del tamaño de los hematíes y de su número, los cuales se alteran con la anemia [Thomas et al 1993], el tabaco, la edad y el tratamiento con fármacos [Zlonis 1993]. Otro de los inconvenientes de la VSG es que cambia lentamente con la inflamación [Gabay & Kushner 1999]. Sin embargo, su determinación es sencilla y con un bajo coste, y a diferencia de la PCR no hay diferencias significativas entre pacientes con CU y EC [Saverymuttu et al 1986].

II. 4. ii. 4. Biomarcadores fecales

Los biomarcadores fecales tienen la ventaja que son específicos del proceso inflamatorio intestinal y presentan una buena correlación con las lesiones intestinales [Van der Sluys Veer et al 1999]. La calprotectina fecal es una proteína que une zinc y calcio, con propiedades antimicrobianas y que se

encuentra en el citosol de las células polimorfonucleares. Esta proteína refleja la infiltración de leucocitos en la mucosa intestinal, es uno de los biomarcadores más fiables utilizados en la práctica clínica, y presenta una mejor correlación con la endoscopia que la PCR [Smith & Gaya 2012]. Otra alternativa, aunque menos utilizada en la clínica por la poca disponibilidad de su ensayo, es la lactoferrina fecal. La lactoferrina fecal está presente en los neutrófilos que se translocan al tracto gastrointestinal durante una inflamación, y es liberada cuando entran en apoptosis apareciendo en heces [Zhou et al 2014].

II. 4. ii. 5. Albúmina

La albúmina es una proteína sintetizada por el hígado que se encuentra en grandes cantidades en la sangre, supone aproximadamente la mitad de las proteínas plasmáticas. Cumple funciones de proteína transportadora, permite mantener la presión osmótica del compartimento vascular en rangos adecuados y es un antioxidante natural. La concentración normal en la sangre humana oscila entre 3,4 y 5,4 gramos por decilitro [McPherson 2011]. La albúmina, como biomarcador de la EII, presenta uno de los más altos coeficientes de correlación con los síntomas de la enfermedad ($r=0.80$) [Moran et al 1995]. Durante el proceso inflamatorio intestinal, la albúmina se pierde por la heces y disminuye sus niveles en suero en un bajo estado nutricional [Colombo et al 2012].

Los marcadores biológicos revisados: ANCA, ASCA, PCR, VSG, calprotectina, lactoferrina y albúmina, distan de ser marcadores ideales, pudiendo ser válidos en determinadas situaciones clínicas. Sin embargo, continúa la búsqueda de nuevos biomarcadores que permita al gastroenterólogo tomar decisiones en base a datos objetivos.

II. 5. Mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inflamatoria

Nuestro intestino está expuesto a un gran número de antígenos procedentes de los alimentos, así como, a las bacterias que se alojan en el lumen intestinal

necesarias en procesos asociados con la asimilación de nutrientes. Por ello, el sistema inmunológico debe diferenciar entre bacterias comensales y patógenos bacterianos, víricos y parasitarios, regulando el equilibrio entre la tolerancia antigénica y la respuesta inflamatoria. Por esta razón, disfunciones del sistema inmunológico pueden desencadenar una patología intestinal [Iweala & Nagler 2006].

II. 5. i. Barreras de protección innata

Tanto las células epiteliales como el moco secretado por las células caliciformes, forman una barrera física y química contra las infecciones. Esta barrera permite que no entren en nuestro organismo bacterias o patógenos presentes en la luz intestinal.

El moco es la capa externa del intestino y se encuentra en contacto con la flora bacteriana, tiene un grosor de aproximadamente 100 μm , y está compuesto de glicoproteínas denominadas mucinas (Muc1 y Muc2), proteínas antimicrobianas, y presenta una baja densidad de bacterias. Este moco, entre otras funciones, impide que las bacterias se adhieran a la superficie epitelial y puedan dañarla o colonizarla [Tytgat *et al* 1994].

Alteraciones en las células productoras de moco como en la composición del mismo, debido por ejemplo a factores genéticos, pueden ser causa desencadenante del desarrollo de un proceso inflamatorio intestinal y permitir la cronificación del mismo [Larsson *et al* 2011].

Bajo la capa de moco intestinal se encuentra el epitelio, de manera general, presenta cinco tipos de células en la superficie epitelial: i) enterocitos absortivos; ii) células caliciformes productoras de moco; iii) células de Paneth productoras de factores de crecimiento y antimicrobianos; iv) células enteroendocrinas productoras de hormonas; v) células del sistema inmune centinela como linfocitos interepiteliares, células M y prolongaciones de células dendríticas que llegan a la superficie epitelial [Wallace *et al* 2014].

Los patógenos o bacterias capaces de superar esta primera línea de defensa por un aumento de la permeabilidad del epitelio u otras razones como puede

ser el daño en la integridad de la capa intestinal desencadenan rápidamente una respuesta inmunitaria innata.

II. 5. ii. Respuesta inmune innata

Una vez que los microorganismos superan la primera línea de defensa, los macrófagos residentes en el intestino son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como los lipopolisacáridos bacterianos, ADN y ARN bacteriano, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico y otros carbohidratos presentes en la pared celular de bacterias, levaduras y hongos. Los receptores capaces de reconocer estas estructuras reciben el nombre de receptores de patrones de patógenos (PRRs). Entre los PRRs se encuentran:

- Los receptores tipo Toll ó *Toll like receptor*, presentes en la membrana de macrófagos y células dendríticas [Beutler B et al 2006].
- Las proteínas NOD, las cuales actúan como sensores intracelulares de una infección bacteriana, reconociendo fragmentos de proteoglicanos de la pared bacteriana. Estas proteínas están presentes en el citosol de células epiteliales, macrófagos y células dendríticas [Strober et al 2006].

La interacción de PAMPs y PRRs provoca la activación de la vía NF-KB y la consecuente producción, por parte principalmente de los macrófagos, de citocinas inflamatorias y quimiocinas atrayentes de otras células del sistema inmune innato, como los neutrófilos y los monocitos [Doyle & O'Neill 2006]. Pero el papel de los macrófagos no se limita solo a esto, también son capaces de eliminar de manera directa microorganismos invasores mediante fagocitosis. La fagocitosis consiste en que una vez que el patógeno está unido al macrófago por receptores de reconocimiento, este queda envuelto por la membrana del macrófago, y posteriormente es internalizado formando el fagosoma. A continuación, el fagosoma se fusiona con el lisosoma del macrófago formando el fagolisosoma, el cual produce la lisis del patógeno [Weiss & Schaible 2015].

Entre la citocinas liberadas por los macrófagos activados en una respuesta innata se encuentran:

- IL-1- β : destruye el tejido local en el foco de infección permitiendo el acceso de células efectoras.
- IL-6: actúa como quimioatrayente de neutrófilos al foco de infección.
- TNF- α : es una hormona glucopeptídica, que induce cambios en las moléculas de adhesión de las células que forman el endotelio vascular aumentando la permeabilidad del mismo, lo que conlleva un aumento de inmunoglobulinas G, de células inmunitarias, de proteínas del complemento hacia el tejido infectado y que son necesarias para la defensa del huésped; por otro lado, contiene la infección local evitando la propagación de la misma a nivel sistémico por favorecer la coagulación de la sangre. Sin embargo, tiene la capacidad de inducir proteólisis y por tanto la destrucción tisular. La liberación masiva de TNF- α a nivel sistémico causa un edema, colapso de los vasos sanguíneos y puede provocar un fallo multiorgánico. El TNF- α es crucial en la respuesta del organismo frente a una infección, pero una respuesta exacerbada del organismo puede provocar efectos no deseados [Pfeffer 2003]. Por ello se han desarrollado anticuerpos específicos dirigidos contra esta proteína con fines terapéuticos. Estos anticuerpos, son ampliamente usados en el tratamiento de diversas enfermedades como son la artritis reumatoidea [Gonzalez-Juanatey et al 2006], la espondilitis anquilosante [Fausel & Afzali 2015], y la EII [Peyrin-Biroulet 2010], entre otras.

La interacción de la IL-1- β , la IL-6 y el TNF- α con el hígado, forman parte de la respuesta de fase aguda, lo cual va a generar en el organismo cambios metabólicos (pérdida de masa muscular y aumento de lipólisis), neuroendocrinos (fiebre y aumento de cortisol), hematopoyéticos (anemia, leucocitosis y trombocitosis), así como la síntesis de proteínas de fase aguda. Dichas proteínas pueden reconocer PAMPs y opsonizar patógenos para su

eliminación, entre otras funciones [Cecilian *et al* 2002]. La PCR, la proteína amiloide sérica y el fibrinógeno son proteínas de fase aguda destacadas, algunas de ellas son utilizadas en clínica como parámetros bioquímicos para determinar el estado inflamatorio o severidad de la enfermedad en pacientes con EII, y han sido incluidos en distintos índices de la enfermedad como hemos visto anteriormente.

A pesar de lo dicho, el sistema inmune innato no es muy específico, porque solo reconoce determinadas estructuras moleculares presentes en determinados patógenos y tampoco dota de una inmunidad duradera. Sin embargo, tiene como ventaja que confiere una respuesta rápida (minutos u horas). Si este sistema no es capaz de parar la infección, se desencadena una respuesta adaptativa.

II. 5. iii. Respuesta inmune adaptativa

Las células presentadoras de antígeno son capaces de captar patógenos del medio extracelular mediante endocitosis, una vez en el interior, los fragmentos obtenidos procedentes de la degradación parcial del patógeno se unen al CMH. Las células dendríticas, los macrófagos y las células B son capaces de realizar esta función.

Las células dendríticas residentes en casi todos los tejidos son claves en la respuesta adaptativa. Estas células mediante un mecanismo de macropinocitosis independiente de receptor son capaces de captar material extracelular como virus y bacterias. Una vez en el interior, los patógenos son destruidos, y sus fragmentos son presentados a los linfocitos en la superficie de las células dendríticas unidos al CMH. Esta interacción célula-célula junto con otros estímulos favorece la proliferación y diferenciación de los linfocitos *naïve*. Hay dos grandes tipos de CMH, el I y el II. En una infección por virus o bacterias que se replican en el citosol o en el núcleo, fragmentos del mismo son presentados unidos al CMH I, produciendo la activación de linfocitos T CD8+ ó citotóxicos, capaces de reconocer y destruir células infectadas [Grommé & Neefjes 2002]. Sin embargo, cuando las bacterias o los parásitos

se replican en el sistema vesicular, los fragmentos son presentados en la superficie unidos al MCH II, y activan linfocitos B y T CD4+ *helper* ó colaboradores, encargados de activar otras células [Villadangos 2001].

Una vez que un linfocito *naïve* ha reconocido el antígeno, éstos sufren una serie de cambios morfológicos como la descondensación de la cromatina, la aparición del nucléolo y el aumento de volumen. En esta primera etapa sufren un proceso de proliferación denominado expansión clonal, seguido de la diferenciación a linfocitos efectores. Este proceso que dura entre 4 y 5 días conlleva cambios en los receptores de los linfocitos que evita que sigan recirculando entre la sangre y los tejidos linfoides periféricos y se dirijan a la zona de infección [(Ahmed et al 2009 (A)].

Los linfocitos B son células plasmáticas capaces de producir anticuerpos específicos contra un antígeno, los cuales son liberados a los líquidos corporales (sangre y linfa), a este hecho se le conoce como respuesta inmunitaria humoral. Los anticuerpos son glicoproteínas constituidas por dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras pequeñas. Hay 5 clases distintas o isotipos de anticuerpos dependiendo de la forma de la cadena pesada. A esta región, que determina el isotipo, se le conoce como fracción cristalizable o Fc, y permite la degradación del antígeno desencadenando una respuesta inmune apropiada. Por otro lado, el ápice de los anticuerpos presenta una región hipervariable que permite el reconocimiento específico de un número extremadamente alto de antígenos, a esta región se le denomina fragmento de unión al antígeno ó región Fab [Market & Papavasiliou 2003].

Los anticuerpos pueden llevar a cabo la defensa del hospedador de tres modos [Forthal 2014]:

- Neutralización: los anticuerpos pueden formar inmunocomplejos con el patógeno impidiendo la entrada del mismo en las células del organismo, y por lo tanto evitando su infección.
- Opsonización: el patógeno es reconocido por la región Fab de los anticuerpos, de este modo quedan marcados para que las células

fagocíticas, a través de la región Fc del anticuerpo, sean capaces de detectarlo y fagocitarlo.

- Activación del complemento: el antígeno es rodeado por los anticuerpos, y la región Fc de estos últimos actúan como receptores de los componentes de la cascada del complemento. Esta cascada está formada por 30 proteínas séricas, que junto a los anticuerpos forman el complejo de ataque a membrana capaz de inducir la lisis de la célula diana.

Sin embargo, hay patógenos como virus, algunas bacterias y parásitos, que son capaces de replicarse dentro de las células y por tanto no son accesibles a los anticuerpos. En este sentido, cobran vital importancia la respuesta inmune celular encabezada por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden expresar en su superficie dos tipos de *cluster* de diferenciación (CD), CD4 o CD8. Los linfocitos T CD8+ *naïve* cuando son activados se diferencian a linfocitos T citotóxicos capaces de eliminar directamente las células infectadas. Los linfocitos T CD4+ indiferenciados al activarse se les denominan colaboradores o *helper*, activan otras células del sistema inmune, y pueden diferenciarse a linfocito Th 1, Th 2 o Th 17.

La activación de las células T *naïve* se controla mediante diversas señales:

- Activación específica del receptor de antígeno.
- Las moléculas coestimuladores de la célula presentadora de antígeno.
- Las citocinas del medio.

En cuanto a las moléculas coestimuladoras, la más importante es la B7 que está presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno y es capaz de estimular el receptor CD28 de linfocitos T *naïve*. Esta coestimulación de linfocitos T dependiente de CD28 induce la expresión de IL-2 y su receptor de alta afinidad impulsando su crecimiento de manera autocrina. El reconociendo de antígeno por parte de un linfocito T en ausencia de molécula

coestimuladora induce bajos niveles de IL-2 y por ende la no proliferación de la célula [Bour-Jordan & Blueston 2002]. Se ha demostrado que inmunosupresores como la ciclosporina A inhiben la producción de IL-2 al interrumpir la señalización a través del receptor de la célula T.

La diferenciación de los linfocitos T CD4+ es más amplia y en gran medida es condicionada por el ambiente en el que se encuentra. Obteniéndose diferentes subtipos de linfocitos T efectores [Abbas et al 1996]:

- Linfocito T *helper* 1, Th 1: el ambiente que favorece la diferenciación de linfocitos T *naïve* a este subtipo de linfocito T efector es mediada por IL-12 e IFN- γ . La IL-12 es producida por las células dendríticas, mientras que el IFN- γ es generado por los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas entre otras. Estas dos citocinas activan la expresión de IL-2 e IFN- γ a través de la cascada de señalización JAK (Janus cinasa)/ STAT-1 (transductor de señal y activador de la transcripción 1) y el factor de transcripción T-bet. La función de los linfocitos Th 1 es activar los macrófagos infectados por patógenos y por otro lado, coestimula la producción de anticuerpos, principalmente IgG.
- Linfocito T *helper* 2, Th 2: la IL-4, generada por células dendríticas, es la citocina más potente inductora de este subtipo de linfocitos T a partir de linfocitos T *naïve*. La IL-4, a través de la cascada de señalización STAT6 (transductor de señal y activador de la transcripción 6)/ GATA-3 (factor de transcripción 3 que se une a la secuencia de nucleótidos guanina, adenina, timina, adenina), induce su propia expresión de manera autocrina. La función de estos linfocitos es activar células B indiferenciadas e inducir el cambio del isotipo del anticuerpo a IgE. Los anticuerpos con este isotipo son necesarios para combatir parásitos y son causantes de las alergias.
- Linfocito T *helper* 17, Th 17: este tipo de respuesta inmunológica va dirigida contra bacterias extracelulares y hongos. Las citocinas claves que la inducen son el TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) y la IL-6, las cuales promueven la diferenciación de linfocitos T *naïve* a

linfocitos Th 17. Este subtipo de linfocitos expresan grandes cantidades de IL-17 e IL-6.

Th 1, Th 2 y Th 17 son respuestas inmunológicas adaptativas encaminadas a la eliminación de distintas clases de patógenos que pueden infectar y dañar nuestro organismo. Pero cuando se ha solventado la infección, es necesario que se supriman las células T activadas para que no se produzca la destrucción de tejido propio y así evitar problemas de autoinmunidad, restringiendo la inflamación y manteniendo la tolerancia. En este sentido cobran vital importancia las células T reguladoras. Se trata de células CD4+ que expresan el receptor de IL-2 y el factor de transcripción FOXP3 (*forkhead box P3*). Este factor de transcripción interfiere en el promotor de la IL-2 impidiendo su transcripción. Una vez activadas las células T reguladoras median sus efectos por contacto directo y/o secreción de citocinas. Las citocinas más relevantes que restringen la autoinmunorreacción son el TGF- β y la IL-10 que actúan como inmunosupresores [Sakaguchi 2005].

Después de que el antígeno ha sido eliminado del organismo y se haya resuelto la infección, algunas células B y T persisten, dando lugar a células memoria capaces de responder rápidamente a una reinfección por el mismo patógeno. A este suceso se le conoce como memoria inmunitaria y es la base de las vacunas [Ahmed et al 2009].

II. 6. Tratamiento farmacológico de la enfermedad inflamatoria intestinal

Tradicionalmente, el objetivo de la farmacología de la EII ha sido reducir el número de recaídas de los pacientes y alargar el periodo de remisión. Los aminosalicilatos representan la primera línea en el tratamiento de pacientes con CU con un índice de actividad de la enfermedad bajo o moderado, y es utilizado con el fin de inducir y mantener remisión. Diversos estudios han demostrado que el ácido 5-aminosalicílico tanto en su presentación oral como rectal, promueven la curación de la mucosa y disminuye el estrés oxidativo generado en la zona inflamada. A pesar de los beneficios que presentan esta familia de fármacos, el tratamiento sólo es capaz de aliviar algunos síntomas

subyacentes de la enfermedad [Perrotta et al 2015]. En pacientes con una enfermedad fistulizante, caracterizada por la presencia de abscesos intestinales, durante cortos periodos se les administra antibióticos para evitar que las bacterias del lumen intestinal entren en la sangre y provoquen una infección sistémica, o septicemia. No es recomendable alargar este tratamiento en el tiempo ya que la biota constituyente del tracto intestinal es necesaria para la asimilación completa de los nutrientes. En ocasiones, en los brotes de la enfermedad, suele administrarse corticoides, los cuales presentan una fuerte capacidad antiinflamatoria, pero importantes efectos adversos si se usan durante largos periodos de tiempo, por ejemplo pueden dar lugar a hipertensión arterial, hiperglucemia y osteoporosis entre otros efectos adversos. Aunque, son muy eficaces por la rapidez con la que alivian los síntomas e inducen remisión, hay pacientes no respondedores a los corticoesteroides (corticorefractarios) o que con el tiempo se vuelven dependientes de ellos (corticodependientes) [Fasci-Spurio et al 2013]. Ante esta situación, se opta por la administración de fármacos inmunomoduladores como el metotrexato, las tiopurinas (azatioprina, mercaptopurina y tioguanina) y los anti-calcineurínicos (ciclosporina y tacrolimus). Todos ellos poseen potentes características inmunosupresoras.

Uno de los grandes problemas de la enfermedad puede ser la desnutrición del paciente [O'Keefe 1996]. El déficit nutricional puede provocar a su vez otras enfermedades graves derivadas de la carencia de vitaminas y bioelementos esenciales. Este hecho afecta más a la población pediátrica ya que la desnutrición puede generar un retraso en el crecimiento. Por ello, la terapia nutricional está siempre presente en algún momento de la historia clínica del paciente.

A pesar de la gran variedad de fármacos disponibles, en la actualidad no disponemos de tratamientos médicos o quirúrgicos curativos para la EII, por lo que los objetivos del tratamiento son inducir y mantener la remisión, controlando la actividad inflamatoria para evitar la aparición de complicaciones. Los aminosalicilatos, los antibióticos, los corticoides, las tiopurinas y el metotrexato, que son los fármacos que clásicamente han constituido el arsenal terapéutico más importante para el tratamiento de la EII, han demostrado ser eficaces en el control de los síntomas pero no modifican la historia natural de la

enfermedad. Sin embargo, con el desarrollo de los agentes biológicos, fármacos bloqueantes de mediadores específicos implicados en la inflamación, principalmente anti-TNF- α como son el infliximab (IFX), adalimumab, golizumab y certolizumab pegol, han cambiado la manera de tratar la EII refractaria al tratamiento convencional [Talley et al 2011]. Los agentes biológicos a diferencia de los tratamientos clásicos han cambiado el curso de la enfermedad debido a que ha reducido el número de hospitalizaciones, cirugías, uso de corticoides, etc. Sin embargo, se sabe que el IFX no es eficaz en la inducción de la remisión en un tercio de los pacientes [Targan et al 1997]. Por otra parte, la pérdida de respuesta a IFX se produce en hasta el 50 % de los pacientes con EC durante el tratamiento de mantenimiento [Hanauer et al 2002]. Por tanto, los factores asociados con un menor efecto terapéutico de los fármacos anti-TNF- α están siendo investigados desde el punto de vista clínico, inmunológico y genético.

A continuación, se presentan otros agentes biológicos que se están desarrollando como tratamiento de pacientes con EC y CU, o que han sido eficaces en otras enfermedades de naturaleza autoinmune y se están evaluando para el tratamiento de la EII:

- Anti-integrinas como el vedolizumab que es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente a la integrina $\alpha 4 \beta 7$. Este anticuerpo evita la migración de linfocitos al intestino sin afectar la migración de linfocitos a otros órganos, lo que provocaría graves efectos adversos [Jovani & Danese 2013]. En fases I y II se encuentran varios agentes biológicos dirigidos contra moléculas de adhesión como son el etrolizumab [Vermeire et al 2014] y el vatelizumab, entre otros.
- Anti-citoquinas proinflamatorias clásicas, como el ustekinumab, anticuerpo monoclonal humano contra la subunidad p40 de la IL-12 y la IL-23, es eficaz en el tratamiento de la psoriasis y actualmente se está ensayando en la EII [Simon et al 2016].

- SiRNA (ARN pequeño de interferencia) dirigido contra el TNF- α y confinado en nanopartículas ha sido demostrado su eficacia en el silenciamiento postrascriptcional del gen TNF- α en ensayos preclínicos [Xiao *et al* 2013].

Como vemos, los agentes biológicos nos han abierto un gran número de posibilidades para el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de las ventajas sanitarias que presentan los biológicos como agentes terapéuticos, éstos representan una carga económica muy grande para el Estado, hasta el 50% del gasto hospitalario en farmacia representa la terapia con biológicos. De esta necesidad surge el desarrollo de fármacos biosimilares (distintas versiones de copias de los agentes biológicos) ya que los agentes biológicos, además de presentar una gran carga económica, su patente expira en los años venideros. El objetivo de los biosimilares es ser bioequivalente al biológico de referencia en términos de eficacia y seguridad. Actualmente, la farmacología se está dirigiendo hacia el desarrollo de agentes biológicos y biosimilares [Mantzaris 2016].

III. Modelos experimentales para el estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal

III. 1. Inducción mediante el tratamiento con ácido trinitrobenceno sulfónico/etanol

Este modelo experimental inicialmente descrito por Morris y colaboradores [Morris *et al* 1989], está basado en la hipótesis de que los pacientes con EC presentan una mayor permeabilidad de las capas más superficiales del tubo digestivo. El etanol, en este modelo, aumenta la permeabilidad del epitelio intestinal, facilitando el contacto de la lámina propia con antígenos presentes en la luz. Este aumento de la permeabilidad permite que el ácido trinitrobenceno sulfónico, el hapteno, acceda a las capas interiores del colon y reaccione con los aminoácidos de lisina y tirosina de las proteínas presentes en las diferentes células dando lugar a una respuesta inflamatoria. En este modelo se produce una afección transmural con infiltrado de células inmunes y fisuras en la mucosa, dando lugar un aspecto de empedrado de la mucosa, lo cual es

característico de pacientes con EC. A largo plazo, produce una afección crónica con granulomas, úlceras y estenosis. Con este tratamiento se obtiene una colitis con afectación distal que conlleva diarrea sanguinolenta y pérdida de peso. Se ha ensayado este modelo en ratas y ratones con resultados similares [Elson et al 1995]. En este modelo se produce una activación del sistema inmune con elevación de IL-12 e IFN- γ , lo que indica una diferenciación del linfocito T del tipo Th 1 [Neurath et al 1995].

III. 2. Inducción mediante el tratamiento con dextrán sulfato sódico

Este modelo experimental se basa en la administración de dextrán sulfato sódico (DSS) en el agua potable, la cual produce una colitis aguda o crónica dependiendo del protocolo utilizado [Wirtz et al 2007]. Los animales tratados con DSS desarrollan a los pocos días diarrea, a veces acompañada con sangre, y pérdida de peso [Axelsson et al 1996] [Egger et al 2000]. Esto es debido a la formación de lesiones ulcerativas que afectan a la mucosa y submucosa intestinal del colon con la aparición de folículos linfoides y la presencia de displasia epitelial. A largo plazo, este proceso inflamatorio intestinal acarrea una elevada incidencia de cáncer de colon [Okayasu et al 2002].

El mecanismo por el que actúa este polímero sulfatado para inducir colitis está basado en la capacidad citotóxica sobre las células epiteliales intestinales y los macrófagos. Además, el DSS enteral favorece la proliferación de bacterias Gram negativas, que junto con el daño corrosivo en la barrera intestinal y la activación de células inmunes propicia la aparición de lesiones intestinales [Elson et al 1995]. Sin embargo, el mecanismo por el cual actúa no está claro.

IV. Factor inflamatorio de injerto alogénico-1

El AIF-1 es una proteína citoplasmática de bajo peso molecular, 17 KDa, que contiene dominios en forma de mano EF que unen el ión calcio. El gen que codifica para la proteína AIF-1 se encuentra altamente conservado en invertebrados y vertebrados [Deininger et al 2002]. En la especie humana está en el cromosoma 6p21.3. En dicha región se encuentra el conjunto de genes

correspondientes al CMH III, las proteínas de la cascada del complemento, el TNF- α y β , y el NF-KB.

Inicialmente, el AIF-1 fue clonado de macrófagos de rata [Utans *et al* 1995]. Se ha descrito su expresión en diferentes tejidos como el bazo, el timo, el pulmón y la placenta [Autieri 1996], así como, en diferentes células inmunes como macrófagos [Yang *et al* 2005], microglía en el cerebro [Mittelbronn *et al* 2001], células mononucleares de sangre periférica, células de Kuffer del hígado [Nagakawa *et al* 2004], y en linfocitos T [Kelemen & Autieri 2005].

El AIF-1 es un importante factor patogénico en el desarrollo de múltiples enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide [Pawlik *et al* 2016], está involucrado en las lesiones autoinmunes del sistema nervioso durante la encefalomielitis, la neuritis y la uveitis experimentales [Storch *et al* 2002] [Pashenkov *et al* 2000] [Schluesener *et al* 1999], y en la diabetes tipo I [Chen *et al* 1997] [Zhao *et al* 2012], así como en vasculopatías [Tian *et al* 2006] [Wang *et al* 2013]. Se ha demostrado que el AIF-1 aumenta durante el daño cerebral producido por un infarto [Postler *et al* 2000], en las lesiones de la piel que se observan en la psoriasis [Orsmark *et al* 2007] y está implicado en el cáncer gástrico [Ye *et al* 2014] y de mama [Liu *et al* 2008].

Entre las funciones del AIF-1 se ha descrito que promueve la proliferación de las células del músculo liso vascular [Autieri & Carbone 2001], estimula la producción de quimiocinas y aumenta la quimiotaxis de monocitos [Kadoya *et al* 2014]. En relación a la respuesta inmune, se encontró que tras la transfección de AIF-1 en una línea celular de macrófagos, RAW264.7, aumentó en gran cantidad la expresión de IL-6 y la subunidad p40 de la IL-12 tras la estimulación con lipopolisacaridos bacterianos [Watano *et al* 2001]. Estas citocinas juegan un papel central en la respuesta inflamatoria Th 1. En consonancia con lo anterior, se ha demostrado que el AIF-1 promueve la activación y la expansión de los linfocitos T CD4+ durante la encefalomielitis experimental [Chinnasamy *et al* 2015].

Por otro lado, se ha determinado la expresión de ARN mensajero de AIF-1 en el colon y en el intestino delgado de humanos [Autieri 1996], y se encuentra sobreexpresado en la mucosa intestinal de cerdos malnutridos [Mentschel *et al* 2002]. Sin embargo, no se conoce su función en el intestino, pero se ha descrito un aumento de la expresión de AIF-1 en las lesiones intestinales

durante la colitis experimental inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico. En este estudio, los ratones transgénicos que sobreexpresaban el gen AIF-1 sometidos a colitis eran más resistentes a los efectos deletéreos de la enfermedad que los ratones control [Morohashi *et al* 2003]. En relación a la EII, un estudio de GWAS ha relacionado el AIF-1 con el riesgo de padecer EC [Juliá *et al* 2013]. Además, se ha visto alterada la expresión de esta proteína en distintas condiciones patológicas demostrándose un aumento de los niveles de AIF-1 sérico en el rechazo de trasplante de corazón [Autieri *et al* 2002], riñón [McDaniel *et al* 2013] y en la nefropatía diabética [Fukui *et al* 2012]. A pesar de ello, no ha sido validado como biomarcador en ninguna de estas patologías, ni se conoce su implicación en la EII.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La EII se caracteriza por una activación sostenida del sistema inmune [Duchmann *et al* 1995], movilizándose células inmunitarias hacia la zona intestinal afectada [Brazil *et al* 2013]. Aunque la etiología de la enfermedad se desconoce, es innegable que el sistema inmune contribuye en el inicio y la cronificación de la enfermedad. Recientemente se ha relacionado un polimorfismo en el gen del AIF-1 con el riesgo de padecer EC [Julià *et al* 2013]. Esta proteína, se ha determinado en diferentes células del sistema inmune y en el intestino [Autieri 1996], e incluso se ha descrito en un modelo de colitis experimental [Morohashi *et al* 2003]. Sin embargo se desconoce el papel del AIF-1 en la EII.

La activación del sistema inmune de manera recurrente provoca una liberación masiva de moléculas proinflamatorias y un aumento del estrés oxidativo, el cual induce cambios en los diferentes componentes biológicos de nuestro organismo [Rezaie *et al* 2007]. Sin embargo, no existe ningún parámetro que valore este aspecto de la enfermedad. En la actualidad, no hay ningún biomarcador ideal de la EII. Los índices actuales utilizados en la práctica clínica para valorar la enfermedad se basan en síntomas. Por esta razón, la inclusión de parámetros biológicos que valoren la enfermedad de manera objetiva posibilitaría un mejor seguimiento de la misma y la evaluación del efecto terapéutico de un medicamento en los ensayos clínicos.

El IFX, un fármaco anti-TNF- α , ha demostrado ser eficaz en pacientes con EII, logrando cambiar el curso de la enfermedad [Shah *et al* 2016]. Sin embargo, un porcentaje alto de pacientes son no respondedores a este agente biológico [Targan *et al* 1997]. Por esta razón, sería interesante determinar con prontitud la falta de respuesta al medicamento. En este sentido se están evaluando biomarcadores séricos que se relacionen con la eficacia del medicamento. Por ello hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Estudio de la eficacia del IFX durante las fases de inducción y de recuperación de la colitis experimental.
2. Evaluación de posibles biomarcadores de la colitis experimental.
3. Análisis del papel del AIF-1 en la diferenciación *in vitro* del linfocito T.
- 4- Estudio de los niveles séricos de AIF-1 en pacientes con EII.

MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA EFICACIA DEL IFX SOBRE EL ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE LA COLITIS EXPERIMENTAL. IDENTIFICACIÓN DEL AIF-1 COMO UN POSIBLE BIOMARCADOR DE LA EII.

En este primer trabajo que compone la tesis doctoral se va a estudiar la eficacia del IFX en un modelo de colitis experimental en ratas durante las fases de inducción (brote) y reversión (remisión). El modelo experimental utilizado es uno de los más aplicados en estudios preclínicos de dicha enfermedad, consistente en la administración oral de DSS al 5% en el agua de bebida de ratas Wistar macho [Okayasu *et al* 1990]. Este modelo produce una inflamación colónica y reproduce síntomas presentes en pacientes con CU y EC tales como la pérdida de peso, la diarrea y el sangrado rectal.

La desregulación del sistema inmune en la patogénesis de la EII es un hecho constatado [Sartor 2006], de sobra es conocido que tanto en la CU como en la EC se produce una activación sostenida de la respuesta inmune innata y adaptativa [Duchmann *et al* 1995]. Recientemente, el AIF-1 se ha descrito en células inmunes y se ha determinado un aumento de dicha proteína durante la inflamación en diferentes patologías [Zhao *et al* 2013]. Además, el AIF-1 se ha relatado en un modelo experimental de colitis [Morohashi *et al* 2003], pero su papel se desconoce.

Aunque la CU y la EC difieren desde un punto de vista inmunológico [Kakazu *et al* 1999], en ambas enfermedades se produce un aumento de TNF- α [Komatsu *et al* 2001]. El TNF- α es una molécula proinflamatoria secretada por linfocitos, macrófagos/monocitos activados, y otras células del sistema inmune [Peake *et al* 2013]. En relación a esto, el desarrollo de los agentes biológicos en la última década ha supuesto un cambio en el tratamiento y en el estudio de múltiples enfermedades. Los agentes anti-TNF- α , como el IFX, han demostrado su eficacia en la EII favoreciendo la cicatrización de la mucosa que es considerada actualmente el *gold standard* de la enfermedad ya que alteran el curso de la misma [Shah *et al* 2016]. Esto se refleja en una menor severidad de la enfermedad, menos brotes, menos hospitalizaciones, menos cirugías, etc. Sin embargo, uno de cada tres pacientes son no respondedores a IFX [Targan *et al* 1997], y la pérdida de respuesta se produce en hasta el 50 % de los pacientes

con EC durante el tratamiento de mantenimiento [*Hanauer et al 2002*]. Además, el mecanismo por el cual actúa el IFX se desconoce.

Actualmente, la endoscopia es utilizada para valorar la cicatrización de la mucosa, pero esta es una técnica que requiere tiempo y es costosa. Sin embargo, se ha determinado una buena correlación entre la mejoraría endoscópica e histológica [*Geboes et al 2005*]. Además, la curación a nivel histológico en ausencia de lesiones endoscópicas es predictiva de recaídas en pacientes con CU en remisión clínica y endoscópica [*Bessissow et al 2012*]. Por estas razones sería interesante determinar marcadores histológicos de buen pronóstico en la EII.

En este primer trabajo de la tesis doctoral se evalúa el efecto del IFX en la colitis experimental inducida por DSS, enfocado en la búsqueda marcadores histológicos a nivel colónico útiles para monitorizar el desarrollo de la colitis y que puedan predecir a largo termino la buena respuesta a fármacos. A su vez, se estudia el AIF-1 como posible marcador sérico de la actividad de la EII en humanos

Para desarrollar estos objetivos, se utilizó un modelo de colitis en rata inducido por DSS al 5% en el agua de bebida durante 5 días (fase aguda), el sexto día se retiró el DSS (fase de recuperación) hasta el día 15, término del experimento. Se evaluó el efecto del IFX a nivel macroscópico, monitorizándose el índice de actividad de la enfermedad, el índice diarreico, el agua y la comida consumida, y la longitud del colon.

En cuanto a los parámetros bioquímicos, se determinó la glucosa sérica con un analizador hematológico y los niveles de citocinas proinflamatorias mediante citometría de flujo, entre ellas el TNF- α . A su vez, los niveles en suero del fármaco fueron determinados por ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas).

La mucina del colon de rata fue valorada mediante el ensayo del ácido periódico de Schiff. La integridad de la barrera colónica se estudió por microscopía confocal de E-cadherina y β -catenina, y la infiltración de células inmunes se determinó por inmunotinción de AIF-1. Para completar este estudio,

se determinaron los niveles séricos de AIF-1 en los diferentes grupos de animales y en 47 pacientes con EII.

Por otro lado, en secciones de colon de los distintos grupos experimentales se determinó la apoptosis mediante TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling*). Además, se valoraron mediante técnicas inmunohistoquímicas diferentes parámetros en el colon, como por ejemplo:

- a) La proliferación/reparación a lo largo de la cripta mediante la expresión de PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación).
- b) La inflamación en la lámina propia mediante la expresión de PY99 (fosforilación de restos de tirosinas en las proteínas) y de AIF-1.
- c) La diferenciación a lo largo de la cripta mediante la expresión de pp38 (fosforilación de la proteína 38).

Aunque no se observó un efecto del IFX sobre la pérdida de peso de los animales con colitis, las ratas enfermas y tratadas con IFX no presentaron diarrea en la fase de recuperación en relación a las enfermas no tratadas. Este hecho quedó reflejado en el índice diarreico y coincide con la mejoría de las lesiones histológicas observadas durante la colitis mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Durante la colitis experimental se observó una disminución de la capa de mucina, una pérdida de la integridad de la barrera colónica por debilitación de las uniones adherentes, y la infiltración de células inmunes (algunas de ellas positivas para AIF-1), en la lámina propia del colon. Estos cambios a nivel histológico se revirtieron por IFX durante la fase de inducción de la colitis. De manera similar a lo observado en el colon, el AIF-1 aumento a nivel sérico en ratas enfermas, reduciéndose con el tratamiento con IFX.

Por otro lado, la técnica de TUNEL reveló un aumento de la apoptosis de las células epiteliales en el colon de ratas con colitis experimental, sin embargo, en ratas tratadas con IFX la apoptosis disminuyó en las células epiteliales. En cuanto al estudio de proliferación/reparación realizado mediante PCNA se determinó una fuerte tinción en la base de la cripta en el colon de ratas normales, disminuyendo dicha tinción en la región absortiva tal y como se había observado previamente [Richter et al 1992]. En contraste, en ratas con

colitis experimental se observó un fuerte aumento de células PCNA positivas en la región absortiva probablemente debido a un aumento en la reparación por el daño producido por el DSS [Essers *et al* 2005]. Este daño producido en el colon se evidenció por un aumento de PY99, un marcador temprano de inflamación ya que las citocinas proinflamatorias estimulan la activación de receptores de tirosina cinasa [Schindler *et al* 2007]. El tratamiento con IFX revirtió en gran medida estos efectos.

En cuanto a los cambios observados en pp38 como marcador de diferenciación [Houde *et al* 2001], se observó que en las ratas control se expresaba muy poco en las células epiteliales y estaba principalmente fuera del núcleo. En la colitis experimental aumentó de manera drástica en las células epiteliales de la mucosa. El tratamiento con IFX disminuyó la pp38 en la parte apical de las glándulas de Lieberkühn y aumentó significativamente en el núcleo de la base de la misma.

Finalmente, a nivel sérico se encontró un aumento significativo de AIF-1 en pacientes con EII activa frente a pacientes inactivos.

Las ratas con colitis experimental presentaron diarrea, sangre heces y una notable pérdida de peso, reproduciendo los síntomas que se producen en la EII en humanos. A nivel histológico observamos una disminución de la capa de mucina y una pérdida de la integridad de la membrana por alteración de las uniones adherentes, E-cadherina y β -catenina. Esta alteración en la barrera colónica se ha observado en pacientes con EII [Mankertz & Schulzke 2007], y varios estudios atestiguan que la terapia con anti-TNF- α restaura la barrera colónica [Toedter *et al* 2012], al igual que nosotros hemos observado. En relación a esto, estudios *in vitro* en líneas celulares de colon humano, Caco-2 y T-84, demuestran que el adalimumab, un anti-TNF- α , previene de la disfunción de la barrera inducida por TNF- α [Fischer *et al* 2013]. La pérdida de integridad de la barrera colónica provoca alteraciones en la permeabilidad de la membrana, sugiriéndose un aumento de la exposición de antígenos y por tanto un activación e infiltración de células del sistema inmunitario. Por esta razón, se observa un aumento de las células AIF-1 positivas, posiblemente macrófagos y linfocitos [Zhao *et al* 2013], en el colon de ratas enfermas siendo más marcado este hecho en las zonas ulceradas. En concordancia con nuestros resultados,

Mentschel y colaboradores describieron un aumento de AIF-1 en el intestino de cerdos malnutridos, sugiriendo que se debía a un aumento de la presentación de antígenos [Mentschel et al 2002]. El tratamiento con IFX de los animales enfermos provocó una disminución de los niveles de AIF-1 en el colon, lo que se correlacionó con la disminución de los niveles circulantes en sangre de la proteína. Esta observación podría deberse a la inducción de la apoptosis por IFX de las células mononucleares infiltradas en la lámina propia [Eder et al 2013]. En concordancia con los resultados anteriores observamos una disminución significativa de los niveles séricos de AIF-1 en los pacientes con EII inactivos con respecto a aquellos que presentaban actividad.

Es un hecho constatado que el IFX promueve la cicatrización de la mucosa [Shah et al 2016]. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual se produce la cicatrización de la mucosa, nuestros resultados sugieren que puede estar involucrada la p38 (proteína 38). En una situación control, la pp38 se encuentra en el citoplasma de las células absortivas sugiriendo que está relacionada en la apoptosis de células senescentes [Basu et al 2014], por otro lado, en la colitis experimental aumenta de manera drástica en las células epiteliales de la mucosa. El tratamiento con IFX hace disminuir la pp38 en la parte apical de las glándulas de Lieberkühn y aumenta significativamente en el núcleo la base de la misma. Se ha demostrado que la pp38 en la base de la cripta estimula la diferenciación del colon [Houde et al 2001].

Nuestros resultados demuestran que las ratas colíticas tratadas con IFX presentan una mejoría de las lesiones histológicas a nivel colónico en la fase de inducción (día 6), cuya consecuencia es la ausencia de diarrea en la fase de recuperación (del día 6 al día 15) y por lo tanto la mejoría.

En conclusión, nuestros datos apoyan la idea de que la mucina, el AIF-1 y la pp38 podrían ser marcadores histológicos implicados en la cicatrización de la mucosa. En este sentido, se ha sugerido que la cicatrización del colon observada mediante endoscopia predice un buen pronóstico para los enfermos con CU [Colombel et al 2011].

RESEARCH ARTICLE

Infliximab therapy reverses the increase of allograft inflammatory factor-1 in serum and colonic mucosa of rats with inflammatory bowel disease

Irene D. Román^{a#}, David Cano-Martínez^{a#}, María Val T. Lobo^b, María Dolores Fernández-Moreno^a, Borja Hernández-Breijo^a, Silvia Sacristán^c, Patricia Sanmartín-Salinas^a, Jorge Monserrat^d, Javier P. Gisbert^e and Luis G. Guíjarro^{a#}

^aDepartment of Systems Biology, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain; ^bDepartment of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain; ^cInstituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ^dDepartment of Medicine, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain; ^eGastroenterology Unit, Hospital Universitario de La Princesa and Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, Spain

ABSTRACT

Objective: Our purpose was to study the molecular basis of infliximab (IFX) effect on colon mucosa in a colitis model and to identify new biomarkers of mucosal healing.

Methods: Healthy rats and rats which were subjected to experimental colitis induced by dextran sulfate sodium, with or without IFX treatment (in the short- and long-term), were studied along with forty-seven IBD patients. Colon mucosal integrity by periodic acid Schiff (PAS) staining, intestinal damage by immunohistochemistry (proliferating cell nuclear antigen, β -catenin, E-cadherin, phosphotyrosine, p-p38, allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) and colonic mucosal apoptosis by TUNEL staining were evaluated in rats while serum and colon AIF-1 levels were determined in IBD patients.

Results: In rats with colitis, IFX reestablished the epithelial barrier integrity, recovered mucus production and decreased colon inflammation, as verified by reduced serum and colon AIF-1 levels; colon and serum AIF-1 levels were also lower in inactive IBD patients compare to active ones. P38 activation after IFX treatment tended to induce differentiation/proliferation of epithelial cells along the colonic crypt-villous axis.

Conclusions: These findings support AIF-1 as a new biomarker of mucosal healing in experimental colitis and suggest that p38 activation is involved in the mucosal healing intracellular mechanism induced by IFX treatment.

ARTICLE HISTORY

Received 25 May 2015
Revised 6 October 2016
Accepted 22 October 2016
Published online 7 November 2016

KEYWORDS

p-p38; mucin; IBD; dextran sulfate sodium

Introduction


The incidence of inflammatory bowel disease (IBD), such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), has been increasing annually worldwide (Molodecky *et al.* 2012). In CD, inflammation affects all intestine layers, whereas the effects of UC are largely limited to the mucosa (Nikolaus and Schreiber 2007). An increase of several inflammatory cytokines, such as TNF- α , has been observed in both diseases (Komatsu *et al.* 2001). Evidence for this has been provided by clinical trials, which have demonstrated the efficiency of antibodies against TNF- α , such as infliximab (IFX), in both types of disease (Rutgeerts *et al.* 2005, Peyrin-Biroulet *et al.* 2008). However, the clinical response of IBD symptoms to IFX treatment is very variable (Rutgeerts *et al.* 2005, Peyrin-Biroulet *et al.* 2008, Dubinsky *et al.* 2010). Clinical features, antibody status, and laboratory and genetic markers have all been proposed as indicators of response to IFX. Young age, concomitant immunosuppressive treatment, high-serum C-reactive

protein and low-serum TNF- α levels have all been associated with a good response to IFX; whereas smoking status, immunogenicity of IFX or a combination of serological markers [p-antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) positive and anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) negative] have been associated with a poor response (Vermeire *et al.* 2002, Arnott *et al.* 2003, Di Sabatino *et al.* 2010, Miheller *et al.* 2012).

During IBD in rodents and humans, TNF- α increases in the inflamed region (O'Connor *et al.* 2010). This cytokine activates several signaling systems, including Jak2, c-Src and TNF receptor-associated factor-2, stimulating STAT3, p38 and NF- κ B, which leads to an increase in the expression of inflammatory cytokines (IL-8 among others) and/or the induction of apoptosis of immune cells (Jobin *et al.* 1999, Pincheira *et al.* 2008). The activation of p38 by TNF- α signaling during IBD has been demonstrated (Waetzig *et al.* 2002).

However, conflicting results have been observed in the modulation by IFX of p38 and phosphotyrosine STAT3

CONTACT Dr. Luis G. Guíjarro ✉ luis.gonzalez@uah.es Department of Systems Biology, University of Alcalá, Alcalá de Henares 28871, Spain
#David Cano-Martínez, Irene D. Román and Luis G. Guíjarro are responsible for statistical design/analysis. E-mail: luis.gonzalez@uah.es (LGG).

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

signaling in intestinal T-cells of patients with CD (Rosenstiel *et al.* 2005). In this latter study, IFX treatment decreased phosphotyrosine-STAT3 and increased phospho-p38 (Waetzig *et al.* 2002). Moreover, the same group has suggested that differential p38 phosphorylation could define responder and non-responder patients to IFX (Waetzig *et al.* 2003). These controversial results could be explained by the findings of a study on p38 α deletion in a mouse model of IBD, which demonstrated that the enzyme has an opposite effect on myeloid lineage and gut epithelia (Otsuka *et al.* 2010). Mice with specific deletion of p38 α in myeloid cells had less gut inflammation, whereas mice with specific deletion of p38 α in epithelial cells had altered intestinal homeostasis (Otsuka *et al.* 2010). Moreover, using proteomics techniques, the p-p38 pathway has been identified as a molecular signature in UC (Zhao *et al.* 2011). All these previous results strongly indicate that p38 can be involved in the mechanism of IFX.

Mucosal healing is an important goal in the treatment of UC (Colombel *et al.* 2011) because it is associated with improved long-term outcomes of patients (Shah *et al.* 2016). For this reason, histological parameters are particularly useful in confirming clinical improvement in UC (Colombel *et al.* 2011). However, endoscopy (and histology on biopsy specimens) remains the gold standard method for detecting and quantifying bowel inflammation, this technique is expensive, invasive and not well tolerated by patients as the need for repeated colonoscopies affects their life quality. Thus it is clear that a noninvasive marker to detect and monitor intestinal inflammation is needed. In order to identify new predictive markers for monitoring of colitis development and potential healing during treatment with IFX, the expression of several serum and colonic proteins was examined. Specifically, the effects of IFX on clinical signs and on histological parameters through rat colitis were characterized. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is a characteristic protein of immune cells that increases during inflammation (Zhao *et al.* 2013). AIF-1 has been identified as a key regulator in the regulation of immune responses and various inflammatory pathological processes. AIF-1 may be involved in a vast array of inflammatory diseases, such as allograft rejection, autoimmune diseases, inflammatory CNS injury, vasculopathy and cancer (Zhao *et al.* 2013). Thus, measurement of AIF-1 transcript or expression may serve as a clinical marker or a new therapeutic target of these inflammatory diseases. Moreover, it has been shown that p38 is involved in epithelial differentiation. Hence, we explored the possible role of AIF-1 and p-p38 proteins in the development of colitis in rats and potential mucosal healing after treatment with IFX. In parallel, we analyzed serum and colon AIF-1 levels from both inactive and active IBD patients in order to ratify this potential marker.

Methods

Rat experiments

Animals and treatment

Male Wistar rats weighing 180–200 g and aged 12 weeks were housed with a maximum of four animals per cage

under temperature- and light-controlled conditions room ($23 \pm 1.5^\circ\text{C}$) in the Animal House at the University of Alcalá. Animals were handled according to the criteria outlined in the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health. This study was conducted in accordance with the protocols approved by University of Alcalá’s Ethics Committee of Animal Experiments.

Experimental colitis was induced by treating animals with 5% DSS (dextran sulfate sodium) in drinking water (Schepp-Berglind *et al.* 2012). The animals were divided into two experimental models: i) rats treated with DSS for 6 d and sacrificed on the sixth day (*acute/induction phase*), and ii) rats treated with DSS for 6 d and sacrificed on the fifteenth day (*recovery phase*). In each experimental phase, three groups of rats were employed: healthy rats (control group) and rats subjected to experimental colitis, without IFX treatment (DSS group) or with IFX treatment (DSS + IFX group). In the DSS + IFX groups, IFX (5 mg/kg, i.p.) was administered on days 0 and 5 (*acute/induction phase*), or on days 0, 5 and 10 (*recovery phase*). In acute and recovery phase experiments, five or six animals were used per experimental group. Once the rats had been sacrificed, serum and tissues from the colon were obtained. The treatment of rats with DSS in drinking water is the most widely used UC model (Shi *et al.* 2011, Schepp-Berglind *et al.* 2012).

It has been previously shown that the early treatment with an anti-TNF- α antibody (day 0), before the onset of any clinical IBD manifestation, effectively prevents mucosal inflammation in rats; in contrast, when the disease symptoms are established, the treatment is significantly less efficient, improving only the clinical signs but not significantly reducing the pathological features (Milia *et al.* 2009).

The IFX dosage employed (Klotz *et al.* 2007, Fasanmade *et al.* 2009) and the administration protocol used (Cano-Martínez *et al.* 2014) achieve the median IFX peak concentrations reported in the literature for humans (Ternant *et al.* 2006, Cano-Martínez *et al.* 2014).

We have chosen the above-described experimental design because our objective the study of the intracellular mechanism implicated in the potential mucosal healing process induced by IFX treatment.

General assessment of colitis

To characterize the extent of the disease, we determined daily body weight evolution and colon length after sacrifice. Colon length is a good morphologic parameter to indicate the degree of inflammation (Solomon *et al.* 2010). Fecal counts, stool consistency and rectal bleeding were monitored daily. We also measured daily food and water consumption. The disease activity index (DAI) was determined by scoring body weight, stool consistency and blood in stools as described previously, with minor modifications (Table 1A) (Ito *et al.* 2006). The diarrheal index (DI) was calculated by substituting weight loss by the number of fecal

counts per day/g of food consumed (frequency) in the DAI (Table 1B).

Biochemical parameters

Serum samples for biochemical analysis were collected from the rats at the time of sacrifice by cardiac puncture (Table 2). Glucose levels were analyzed using a hematology analyzer, determination of serum IFX levels was performed by ELISA, detection of serum cytokines (IL-1 α , IL-4, IL-17A, MCP-1, IFN- γ and TNF- α) was performed using Rat Cytokine 5 plex Kit FlowCytomix (eBioscience, Vienna, Austria) and serum AIF-1 levels (using a rabbit anti-AIF-1, Wako, Osaka, Japan) were studied by immunoblot techniques.

Tissue preparation

Proximal colon samples were fixed with neutral formalin, washed with PBS, dehydrated with graded ethanol series and embedded in paraffin. Five-micron thick sections were obtained and mounted on silanized glass slides.

Colon mucosal integrity evaluation

Periodic acid Schiff (PAS) and alcian blue (AB) stains were used to evaluate colon mucosal integrity, to visualize goblet cells and above all to differentiate neutral and acidic mucin. Briefly, the samples were dehydrated with ethanol and *n*-butanol for 48 h at 4 °C, after being included in paraffin. Subsequently, they were cut with the microtome (Micron); some samples were also stained with AB (15 min) and

washed with water. Then, the samples were treated with periodic acid (1%) daily for 5 min and washed with distilled water. Finally, treated with the Schiff's reactive (5 min) and again washed and stained with Harris hematoxylin (2 min). The tissue expression of the neutral mucins was determined by means of the histochemical technique of PAS while the expression of acid mucins was determined using the AB technique (Gilks *et al.* 1988). The neutral mucins stained magenta, while the acid mucins stained blue. Only in magenta stained cells is recorded.

Immunohistochemistry

The specific antibodies we used were a mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA, Dako, Barcelona, Spain), a mouse anti-phosphotyrosine (PY 99), a rabbit anti- β -catenin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a mouse anti-E-cadherin (BD-transduction labs, Madrid, Spain), a rabbit anti-AIF-1 (Wako, Osaka, Japan) and a mouse anti-p38 (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). After incubation with the primary antibody, the samples were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (polymer-based system MasVision™ from Master Diagnostica, Spain), chicken anti-rabbit-Alexa Fluor 488 or chicken anti-mouse-Alexa Fluor 594. Nuclei were stained with Caraccís hematoxylin or with a DAPI-staining protocol. Negative controls were performed by incubating the samples with non-immune mouse serum instead of the first antibody.

TUNEL staining

To analyze apoptotic nuclei, the DeadEndFluorometric TUNEL System (Promega, Madrid, Spain) was used according to the manufacturer's instruction. Briefly, deparaffinized and hydrated sections were washed with a 0.85% solution of NaCl at room temperature for 5 min and sequentially washed with PBS (5 min), 4% methanol (15 min) and PBS again (2 washes, 5 min each). After protein digestion (proteinase K, 20 μ g/mL) and a new round of PBS and methanol washes, samples were treated with the equilibration buffer for 7 min and incubated with the buffered nucleotide mixture and the TdT enzyme (at 37 °C for 60 min), all of them supplied with the kit. Then, sections were washed with double-distilled water and cover slipped using FluoroGuard™ non-fade mounting media with Hoechst 33342 (Bio-Rad Laboratories,

Table 1. (A) Scoring system for the disease activity index (DAI) and (B) the diarrheal index (DI).

(A) Disease activity index (DAI)			
Score	Weight loss (% of control)	Stool consistency	Blood in stools
0	X < 1	Normal stool	Normal
1	1 < x < 5		
2	5 < x < 10	Loose consistency	Red anus
3	10 < x < 20		
4	20 < x	Diarrhea	Gross bleeding
(B) Diarrheal index (DI)			
Score	Frequency (% over the control)	Stool consistency	Bleeding
0	X < 25%	Normal	Normal
1	25% < x < 50%		
2	50% < x < 75%	Loose of consistency	Red anus
3	75% < x < 100%		
4	x > 100%	Watery	Blood in stools

Table 2. Biochemical parameters in the induction phase of DSS model.

	Control		DSS		DSS + IFX	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
Glucose (mg/dL)	178.0	(177.0–199.0)	144.5 ^a	(127.0–156.0)	165.0	(157.0–169.0)
TNF- α (pg/mL)	149.4	(111.6–184.2)	353.4	(147.1–430.2)	28.6 ^d	(27.9–29.2)
IFX (μ g/mL)	–	–	–	–	110.2	(46.3–195.4)

Effect of infliximab. Healthy rats (control group) and rats subjected to experimental colitis, without (DSS group) or with Infliximab treatment (DSS + IFX group). Glucose, TNF- α and IFX serum levels were analyzed on the sixth day. Values are median and interquartile range from 5 to 6 animals per group. Data were analyzed by Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test (^a p < .05, ^b p < .01, ^c p < .001; control versus DSS or DSS + IFX) (^d p < .05, ^e p < .001; DSS versus DSS + IFX).

Hercules, CA). Slides were examined on an epifluorescence microscope (Olympus BX50, Olympus Australia, Windsor, Qld, Australia).

Patients

Disease activity

Serum AIF-1 concentrations were measured in 47 patients (23 men and 24 women) with IBD recruited from the out-patient clinic at Hospital Universitario de La Princesa (Madrid). Disease activity was evaluated by partial Mayo score without endoscopy (UC) or Harvey–Bradshaw index (CD). We defined “active” as conditions with a partial Mayo score = 1 or higher (UC) or a Harvey–Bradshaw index = 1 or higher (CD). “Inactive” patients were defined as conditions with a partial Mayo score = 0 (UC) or a Harvey–Bradshaw index = 0 (CD) (Table 3).

Data were collected for each patient included in the study (Table 3). This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki principles. Approval was obtained from the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario La Princesa (Madrid) involved in the study. All patients had signed a research authorization consent form at the time of their clinical assessment.

Serum AIF-1 level

Serum AIF-1 level (using a rabbit anti-AIF-1, Wako, Osaka, Japan) was studied by immunoblot techniques.

Tissue preparation

Colon inflamed tissue (Crohn’s disease affected region) and healthy adjacent tissue from patients were obtained by endoscopy. The colon samples were fixed with neutral formalin, washed with PBS, dehydrated with graded ethanol series and embedded in paraffin. Five-micron thick sections were obtained and mounted on silanized glass slides.

Immunohistochemistry

The specific used antibody was a rabbit anti-AIF-1 (Wako, Osaka, Japan). The procedure used is indicated above.

Statistical analysis

The data are presented as mean \pm SD or as median and inter-quartile range. Data were analyzed by Kruskal–Wallis test with Dun’s multiple comparison test or by Student’s t-tests. Differences were considered statistically significant when $p < .05$.

Results

Effect of IFX on macroscopic features and disease indexes in DSS-induced colitis: induction phase versus recovery phase

Daily measurements of rat body weight and food and water consumption for 15 d were taken. Body weight increased

Table 3. Characteristics of the patients with inflammatory bowel disease. (a) In accordance with the Montreal classification and (b) Some therapy regimens may overlap.

Parameter	All patients (n = 47)	CD (n = 28)	UC (n = 19)
Sex (male/female)	23/24		
Age (years)	45.3 \pm 14.6		
Current smoker (yes/no)	11/33 ^a	7/21 ^a	4/12
IBD (active/inactive)	28/19	18/10	10/09
Mean diseases duration in years mean \pm SD (CI)	9.1 \pm 10.8 (0.5–5.2)	10.5 \pm 12.2 (0.5–5.2)	6.9 \pm 8.1 (0.5–2.4)
R		M (%)	M (%)
Disease extent (UC) ^a			
Left side			7 (36.8)
Proctitis			5 (26.3)
Pancolitis			7 (36.8)
Diseases location (CD) ^a		11 (39.3)	
L1 (Ileal)		2 (7.1)	
L2 (colic)		15 (53.6)	
L3 (ileocolic)			
Behaviour (CD) ^a			
B1 (non-stricturing non-penetrating)		12 (42.9)	
B2 (stricturing)		7 (25)	
B3 (penetrating)		2 (7.1)	
B1+ perianal disease		5 (17.9)	
B2+ perianal disease		2 (7.1)	
Medications			
Non-medication	9 (19.1)	9 (32.1)	18 (94.7)
5-ASA	35 (74.5)	17 (60.7)	1 (5.3)
Azathioprine	7 (14.9)	6 (21.42)	
Methotrexate	3 (6.4)	3 (10.7)	
Infliximab	3 (6.4)	2 (7.1)	1 (5.3)
Adalimumab	4 (8.5)	4 (14.3)	
Surgery	13 (27.7)	13 (46.4)	
Ileocolic resection	10 (21.3)	10 (35.7)	
Perianal	3 (6.4)	3 (10.7)	

SD: standard deviation; CI: confidence interval; IBD: inflammatory bowel disease; CD: Crohn’s disease; UC: ulcerative colitis (numbers in parenthesis are percentages).

^aInformation of current smokers from three patients was not available.

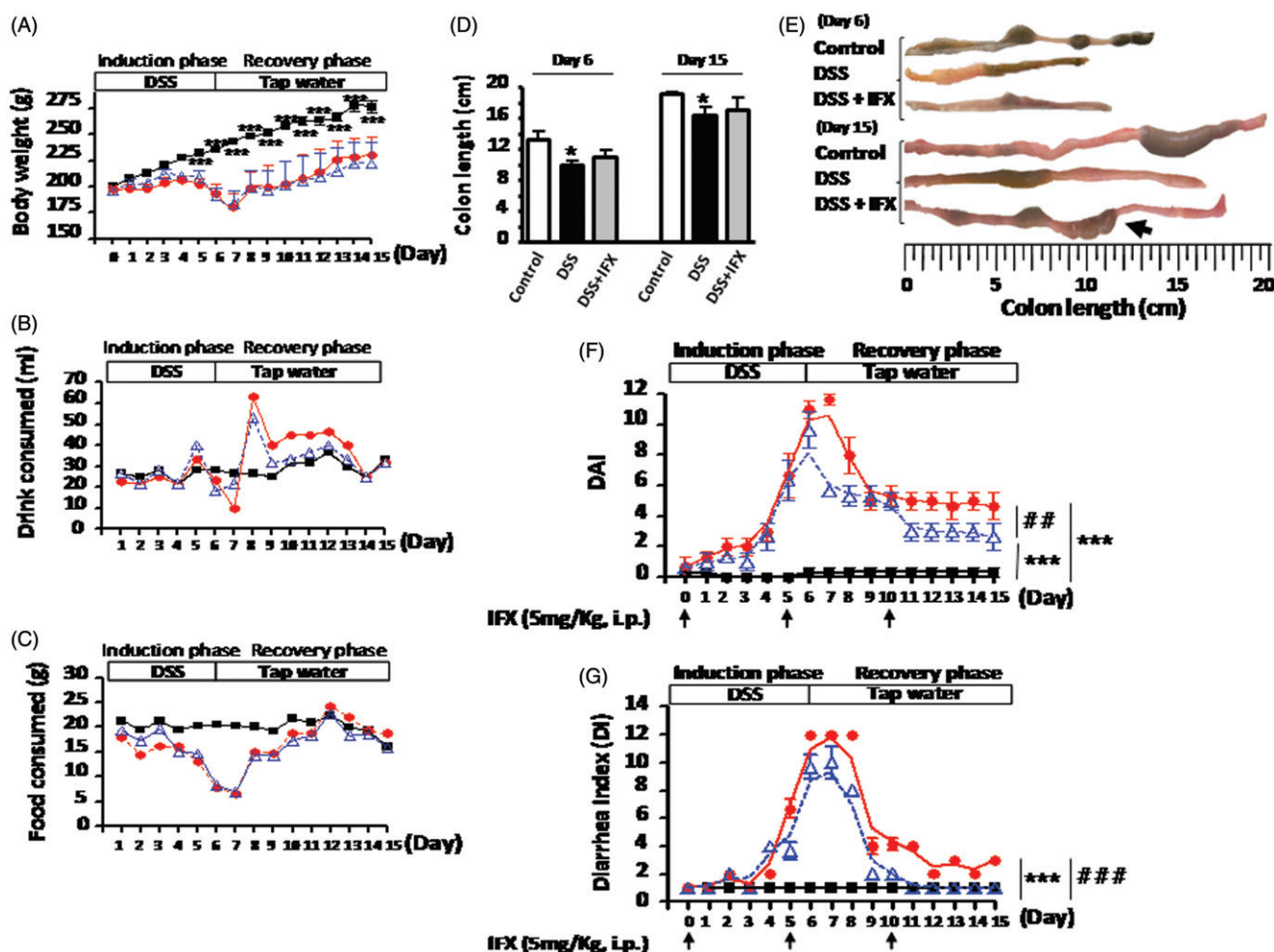


Figure 1. Assessment of experimental colitis in induction and recovery phases. Effect of infliximab on macroscopic features and disease indexes. Experimental colitis was induced by treating animals with 5% DSS (dextran sulfate sodium) in drinking water. The animals were divided into two experimental protocols: i) rats treated with DSS for 6 d and sacrificed on the sixth day (acute/induction phase), and ii) rats treated with DSS for 6 d and sacrificed on the fifteenth day (recovery phase). For each experimental protocol, three groups of rats were employed: healthy rats (control group, black square) and rats subjected to experimental colitis, without infliximab treatment (DSS group, red circle) or with infliximab treatment (DSS + IFX group, blue triangle). In the DSS + IFX groups, infliximab (IFX, 5 mg/kg, i. p.) was administered on day 0 and 5 (protocol i), or on days 0, 5 and 15 (protocol ii). (A) Body weight, (B) food consumed per rat and (C) drink consumed per rat were measured for 15 d in the three study groups. (D and E) Colon lengths were measured on the sixth or fifteenth days in all groups; the chart shows the variation in colon length in the three study groups. Arrow mark indicates recovered stool consistency in the colon. The charts illustrate (F) the disease activity index (DAI) and (G) the diarrheal index (DI) of the three study groups. Values are mean \pm SD from 5 to 6 animals per group and data were analyzed by Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test (***) $p < 0.001$; control versus DSS or DSS + IFX (###) $p < 0.001$, ## $p < 0.01$; DSS versus DSS + IFX).

regularly in control animals, but diminished significantly in comparison with these in the other groups after fifth day of treatment with DSS or with DSS + IFX (Figure 1(A)). Body weight was found to be fairly constant in the groups treated with DSS or DSS + IFX, but decreased significantly ($p < .001$) when compared with the control group after the fifth day of the study (Figure 1(A)). We observed a decrease in food consumption during the induction phase of colitis (up to the sixth day of treatment with DSS); however, normal values were reestablished by the end of the recovery phase (between 6 and 15 d without DSS treatment) (Figure 1(B)). Malabsorption of nutrients as a result of the extensive large intestinal injury could have contributed also significantly to the generation of diarrhea as well as to a loss of body weight. Water consumption showed an irregular profile in both groups of animals treated with DSS, but a clear increase in water intake was observed after withdrawing DSS, which had normalized by the end of the recovery phase in both groups of animals (Figure 1(C)). In addition, the DSS group

showed a significant ($p < .05$) shortening of the colon compared with the control group at 6 and 15 d of treatment (being most severe at sixth day), as it has been previously described by others (Oh *et al.* 2014); however, this reduction showed a trend toward normalization with IFX treatment (Figures 1(D,E)). An anatomical study of the length of the human intestine revealed that the factor showing the strongest correlation with intestinal length was body weight (Hounnou *et al.* 2002). In this regard, we observed a positive relationship between the shortening of the colon and the decrease in body weight measured on the sixth or fifteenth day (Pearson coefficient, $r = .74$). We also observed an inability to form normal feces in the DSS and DSS + IFX groups during the induction phase. However, in the recovery phase, feces were formed normally in the DSS + IFX group, in contrast to the DSS group (Figure 1(E)).

All the changes described above were integrated in the DAI (Table 1(A) and Figure 1(F)), which increased in the DSS group compared to the control group. IFX treatment did not

modify DAI values for DSS-treated animals during the induction phase; on the contrary, when DSS was withdrawn, the recovery in DAI values was faster and significant ($p < .01$) in animals treated with IFX with respect the DSS group (recovery phase) (Figure 1(G)). However, the recovery of DAI was not complete, because we observed significant ($p < .001$) differences of this group regarding control. Analyzing DAI components, we deduced that IFX had an effect on diarrhea. Therefore, we defined a DI (Table 1(B) and Figure 1(G)) that included defecation frequency. Treatment with IFX of rats with colitis reduced the DI to control values, whereas in untreated animals, significant activity remained after withdrawing DSS from drinking water during the recovery phase (Figure 1(G)).

Serological signature in the induction phase of DSS model

At the end of the induction phase, the animals were sacrificed and blood samples were analyzed to determinate serum levels of glucose, IFX, TNF- α and AIF-1. In DSS + IFX group, the level of IFX in serum was $120.4 \pm 35.1 \mu\text{g/mL}$ (Table 2). Glucose levels decreased in the DSS condition and moderately increased with the IFX treatment (Table 2). We tested the systemic level of cytokines (IL-1 α , IL-4, IL-17A, MCP-1, IFN- γ and TNF- α). Administration of DSS produced an increase in TNF- α serum levels (136%; $p < .01$), whereas the serum levels of remaining cytokines showed a tendency to increase in DSS group but this was not statistically significant in any case (supplementary material). Treatment of DSS rats with IFX clearly decreased TNF- α levels by 91% ($p < .001$).

Effect of IFX on serum and mucosal markers of intestinal damage in the induction phase of DSS model

To evaluate colon mucosal integrity, PAS staining was assessed in colon tissue. This was expressed as the ratio between goblet cells showing positive (PAS⁺) and negative (PAS⁻) staining for PAS. The number of PAS⁺ and PAS⁻ cells was counted manually by a single observer. For each calculation, four representative areas in a section were selected. The PAS⁺/PAS⁻ ratio was calculated for each experimental group.

PAS stains glycoproteins, including mucins, allow to evaluate the colon mucosa functionality. In addition, PAS staining allows to visualize goblet cells and, therefore, to evaluate colon mucosal integrity. An increased PAS⁺/PAS⁻ ratio means an increased colon mucosal integrity/functionality.

In the induction phase, the PAS⁺/PAS⁻ ratio in DSS group decreased significantly ($p < .001$) compared to the control group. However, rats treated with DSS + IFX showed a significant recovery in the ratio ($p < .05$), evidenced by the gland profile and good staining with PAS (Figure 2(A)). Since β -catenin interacts directly with E-cadherin to form adherent junctions (AJs), we also examined the localization of β -catenin and E-cadherin in crypt cells. In the DSS group, β -catenin membranous expression in goblet cells was clearly reduced

when compared to control; however, we found a significant increase in β -catenin membranous expression in IFX-treated rats in comparison to the DSS group ($p < .05$) (Figure 2(A)). These observations highlight the role of IFX in establishing intestinal architecture, which is lost during experimental colitis. As a consequence of this latter feature, an inflammatory process was observed in DSS-treated animals which were characterized by an increase in AIF-1 expression in immune cells infiltrated in the lamina propria. Immune cells positive for AIF-1 decreased dramatically in the DSS + IFX group (Figure 2(A)). We observed a similar behavior in serum AIF-1 levels in the same animals (Figure 2(B)).

Serum and mucosal marker of intestinal damage in IBD patients

Human colon samples were histologically analyzed. Representative colon sections immunostained with AIF-1 are shown in Figure 3(A). It is demonstrated in this figure that Crohn's disease affected region shows tissue destruction and it is heavily positive for AIF-1, in comparison to normal region. In addition, intestinal barrier damage is reflected by an increased level of serum AIF-1 in active IBD patients respect to inactive ones (Figures 3(B,C)).

Effect of IFX on colonic mucosal apoptosis and proliferation in the induction phase of DSS model

To study whether experimental colitis is associated with intestinal epithelial cell apoptosis and the effect of IFX on this process, we measured TUNEL staining in colonic tissues. TUNEL-positive nuclei were clearly identified as green-stained nuclei, which indicated the presence of DNA fragmentation due to apoptosis. TUNEL-positive cells were determined by observing 100 cells in randomly selected fields. Cell nuclei were stained in blue with Hoechst (Figure 3).

The number of TUNEL-positive epithelial cells was divided by the total number of epithelial cells to yield the apoptotic index as follows: (number of positively stained epithelial cells/number of total epithelial cells) = Ratio TUNEL/Hoechst (Figure 3).

Few apoptotic cells were observed in control group epithelial cells (Figure 3), whereas colon tissues demonstrated a marked appearance of green apoptotic cells on the surface of the crypt cells after DSS treatment ($p < .001$). In contrast, IFX administration decreased the number of apoptotic epithelial cells, since there was a reduction in the percentage of TUNEL-positive cells. However, IFX treatment increased the number of apoptotic cells in the lamina propria, which suggests the apoptosis of immune cells.

Antibody-against-PCNA was used to reflect the proliferation status and/or repair of DNA in epithelial gland cells (Essers *et al.* 2005). The extent of PCNA staining was expressed as the ratio between cells showing positive (PCNA⁺) and negative (PCNA⁻) staining for PCNA. For each calculation, four representative areas in a section were selected. An increased PCNA⁺/PCNA⁻ ratio means an increased cell proliferation and/or DNA repair.

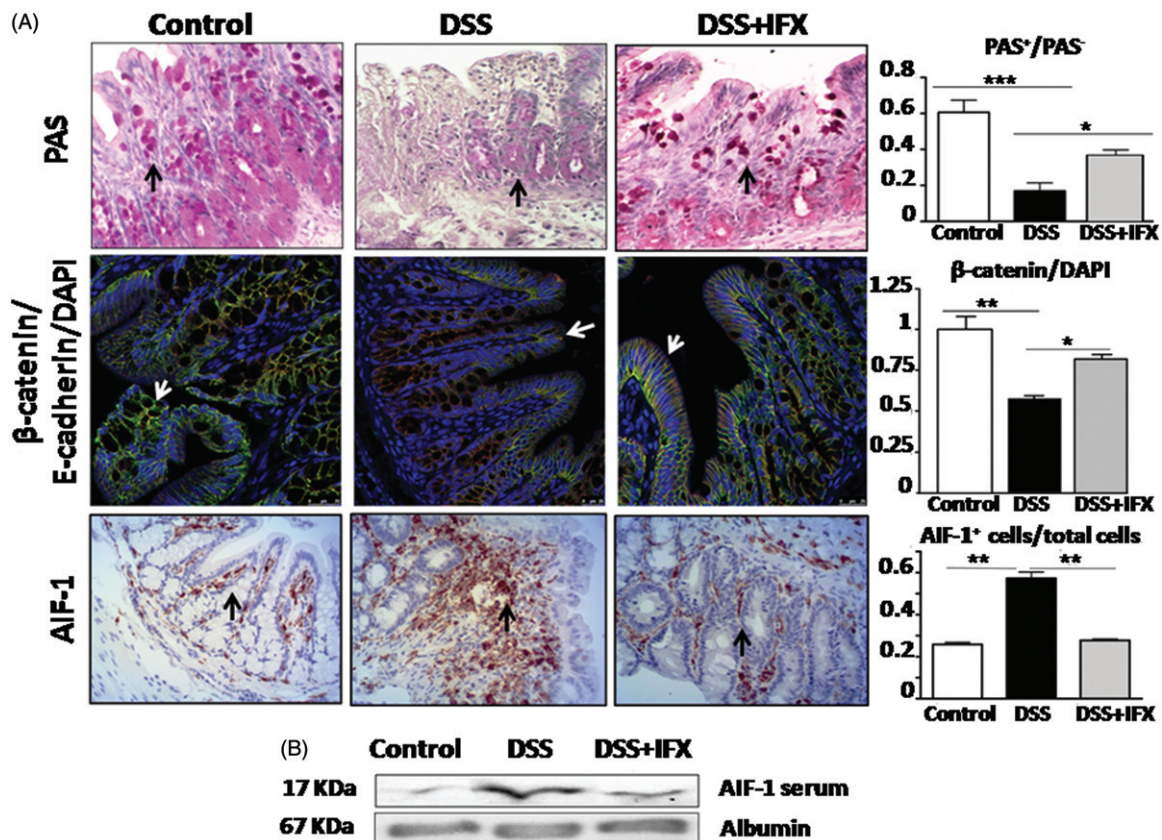


Figure 2. Serum and mucosal markers of intestinal damage in the induction phase of DSS model. Effect of infliximab. (A) Images of PAS staining (at 20X magnification), and immunostaining of β -catenin/E-cadherin and AIF-1 (at 20X magnification). The animals were sacrificed on the sixth day and colon tissue sections were examined with a confocal laser scanning microscope to visualize E-cadherin (red) and β -catenin (green). The arrows indicate that: i) in the DSS group, PAS staining and β -catenin membranous expression decreased significantly with respect to the control and DSS + IFX groups; ii) in the DSS group, AIF-1 expression increased in immune cells infiltrated in the lamina propria. The charts illustrate PAS⁺/PAS⁻, β -catenin/DAPI or AIF + cells/total cells; values are mean \pm SD and data were analyzed by Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$). (B) Western blot analysis was performed to determine serum AIF-1 and albumin levels. Images are representative of four independent experiments.

In normal rat colon, a higher intensity of immunostaining for PCNA is observed in the colon crypt base and in the first part of the gland, where many stem cells emerge and migrate upwards onto the villous; this intensity decreases in the absorptive region, where apoptosis and cell desquamation occurred. However, a significant increase in the PCNA⁺/PCNA⁻ ratio was observed in the colon of animals treated with DSS ($p < .001$) (Figure 3), indicating that the experimental colitis increased cell proliferation and/or DNA repair. In this latter condition, PCNA⁺ cells were observed even in the tip of the gland. In the colon of the DSS + IFX group, PCNA staining of epithelial cells did not significantly differ compared to the DSS group (Figure 3).

Thus, experimental colitis increased proliferative activity and/or DNA repair of colon epithelial cells, but IFX did not exert any effect on this.

Effect of IFX on colonic mucosal PY99 and p-p38 expression in the induction phase of DSS model

Phosphorylation of tyrosine residues (anti-phosphotyrosine-mAb, PY99) in bowel mucosa is considered an early marker of inflammation because the most important

proinflammatory cytokines stimulate receptors coupled to tyrosine kinase activity. To calculate the PY99⁺/PY99⁻ ratio, four representative areas in a section were selected. An increased PY99⁺/PY99⁻ ratio means an increased inflammation. The PY99⁺/PY99⁻ ratio increased in the colon glands of ill rats compared to normal animals, whereas in sick rats treated with IFX, the values were similar to the control group (Figure 4(A)).

Activation of the phosphotyrosine kinase cascade is coupled to the p38 MAPK pathway, which has been involved in mediating cell death and/or survival in response to stress-inducing stimuli depending on physiological context. In our set of experiments, control animals showed very scarce p-p38 MAPK staining in the absorptive part of the Lieberkühn glands, suggesting the involvement of these in the death of aged cells. However, p-p38 MAPK staining in the DSS group increased dramatically in the same region, suggesting they play a role in the apoptosis of epithelial cells during colon inflammation. During IFX treatment of rats with colitis, the p-p38 MAPK staining profile changed drastically; p-p38 was localized mainly in the zone of the crypt with the most abundant number of proliferating and/or differentiating cells (Figure 4(B)).

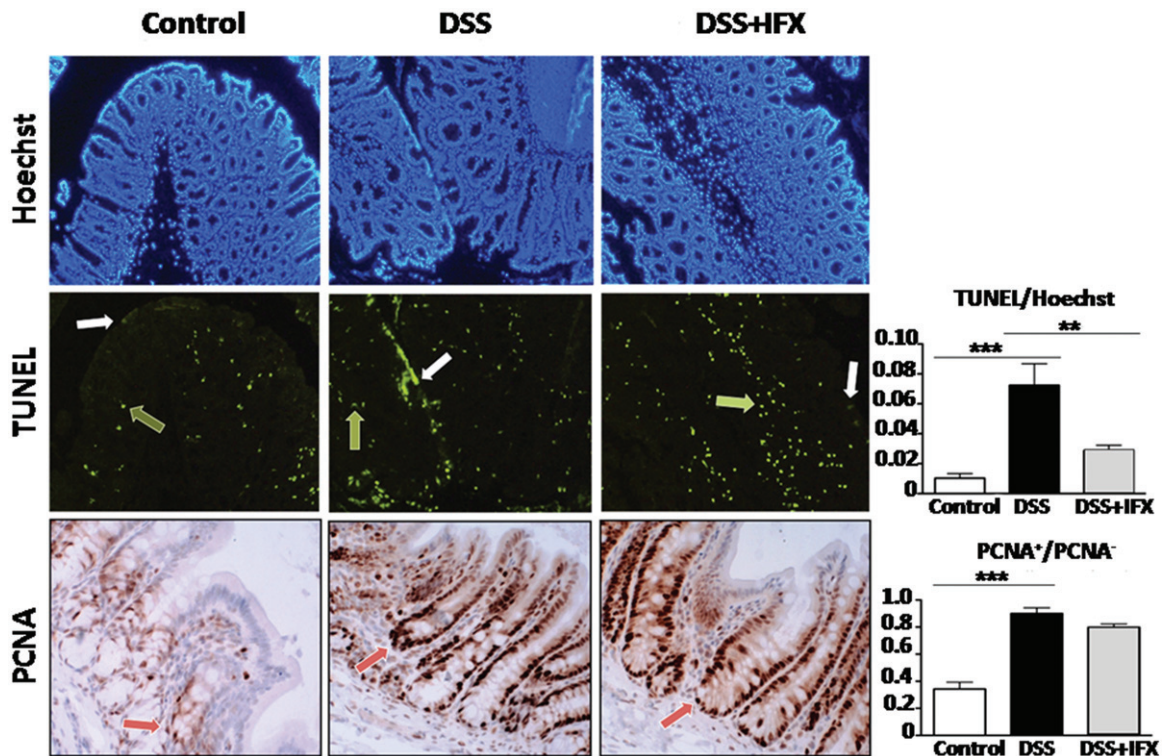


Figure 3. Evaluation of colonic mucosal apoptosis and proliferation in the induction phase of DSS model. Effect of infliximab. Hoechst staining (at 4× magnification), TUNEL assay (4×) and immunohistochemical staining of PCNA (20×) in colon tissue sections. Laser scanning confocal microscopy was used to visualize apoptotic nuclei in green (TUNEL assay) or total nuclei in blue (Hoechst staining). The arrows indicate TUNEL-positive cells (the white arrows indicate epithelial cells apoptosis and the green ones indicate apoptosis in immune cells infiltrated in the lamina propria). Pictures are representative of four-colon sections in each experimental group: healthy rats (control group, left) and rats subjected to experimental colitis, without infliximab treatment (DSS group, middle) or with infliximab treatment (DSS + IFX group, right). The animals were sacrificed on the sixth day. TUNEL-positive and total cells were counted per field by observing 100 cells in randomly selected fields and the TUNEL/Hoechst ratio was calculated. The ratio between cells showing positive and negative staining for PCNA was also determined. The orange arrows show the proliferation of epithelial gland cells. The charts illustrate TUNEL/Hoechst and PCNA⁺/PCNA⁻ ratios. Values are mean ± SD. Data were analyzed by Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test (** $p < .01$; *** $p < .001$).

Effect of IFX on serum and mucosal markers of intestinal damage in the recovery phase of DSS model

PAS⁺/PAS⁻ ratio in DSS group decreased significantly compared with the control group ($p < .001$). It should be noted that, opposite to the induction phase, at the end of the recovery phase (day 15), we found a complete restoration of PAS⁺/PAS⁻ ratio (colon mucosal integrity) in rats treated with DSS plus IFX (Figure 5(A)).

A non-invasive marker to detect and monitor intestinal inflammation is needed. In contrast to p38, AIF-1 concentration can be measured in serum; therefore, we can study the potential correlation between intestinal barrier damage and colon/serum AIF-1 levels. In the DSS group, intestinal barrier damage was reflected by both an increased AIF-1 expression in immune cells infiltrated in the lamina propria and an increased level of serum AIF-1; both parameters decreased dramatically in the DSS + IFX group (Figures 5(A,B)).

Serum and mucosal marker of intestinal damage in IBD patients

Human colon samples were histologically analyzed. Representative colon sections immunostained with AIF-1 are shown in Figure 6(A). Crohn's disease affected region showed tissue destruction and it was heavily positive for AIF-1, compare

to normal region (Figure 6(A)). In addition, intestinal barrier damage was reflected by an increased level of serum AIF-1 in active IBD patients compared to inactive ones (Figures 6(B,C)).

Discussion

IFX is commonly used during flares and to maintain the remission of UC in human beings (Rutgeerts *et al.* 2005). In this study, we have shown the beneficial effects of IFX, being the reversal of histological lesions observed during the induction phase in acute experimental colitis. These changes matched faster remission of the DI during the recovery phase of the group of animals treated with IFX. However, we did not observe any effect of IFX on the loss of body weight in rats with colitis. In this model, a longer period of treatment with IFX is probably necessary to recover body weight loss (Lopetuso *et al.* 2013). Our results suggest that mucin, AIF-1 and p-p38 are both histological biomarkers of mucosal barrier restoration, a reduction in inflammation and a rising in differentiation, and, therefore, of mucosal healing. This is a clinical goal because microscopic healing of the mucosa is associated with improved long-term clinical outcomes in patients with UC (Colombel *et al.* 2011, Shah *et al.* 2016). Our group has recently showed the beneficial effect of IFX on

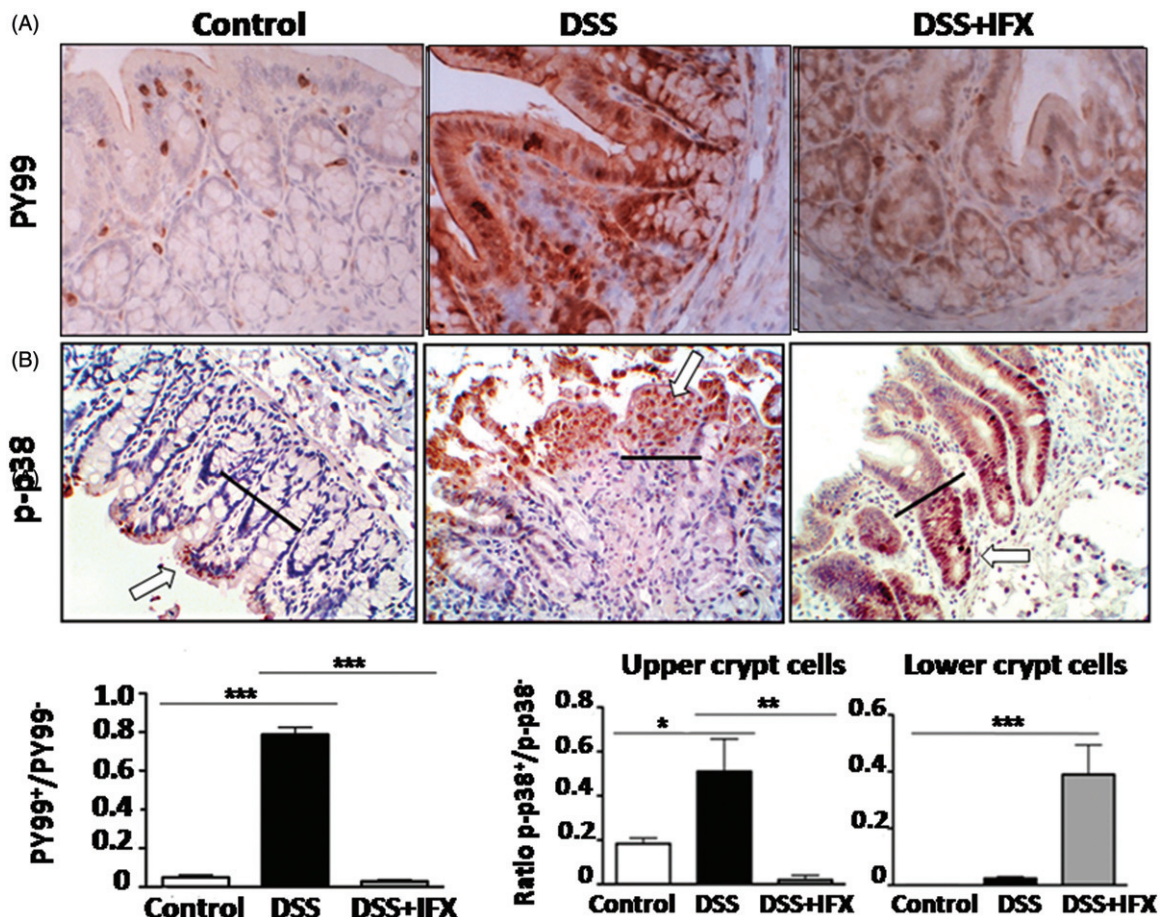


Figure 4. Expression of colonic mucosal PY99 and p-p38 in the induction phase of DSS model. Effect of infliximab. Images are representative of four-colon sections in each experimental group: healthy rats (control group, left) and rats subjected to experimental colitis, without infliximab treatment (DSS group, middle) or with infliximab treatment (DSS + IFX group, right). The animals were sacrificed on the sixth day. (A) The chart illustrates the ratio between cells showing positive and negative PY99 staining, PY99⁺/PY99⁻. PY99 positive and negative cells were counted per field by observing 100 cells in randomly selected fields. (B) In the control group, the white arrow shows a discrete p-p38 MAPK staining in the absorptive part of the Lieberkühn gland, which increased dramatically in DSS rats; however, in DSS + IFX rats, p-p38 was localized mainly in the basal and middle part of the crypt. The charts illustrate the ratio between cells showing positive and negative p-p38 staining, p-p38⁺/p-p38⁻, from lower and upper crypt cells. p-p38 positive and negative cells were counted per field by observing 100 cells in randomly selected fields. Values are mean \pm SD. Data were analyzed by Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test (* $p < .05$, ** $p < .01$ and *** $p < .001$).

colonic mucosa oxidation induced by DSS in rats (Cano-Martínez *et al.* 2014).

In this study, we have shown that DSS-induced colitis leads to: (i) loss of mucosa functionality in some parts of the colon, characterized by a decrease in mucin production (PAS staining), and (ii) loss of epithelial barrier integrity, indicated by the weakening of AJs (β -catenin/E-cadherin expression). As a consequence of these two outcomes, immune system cells migrate to the injured tissue, as verified by the increase of AIF-1 positive cells in the colon from rats with colitis (and Crohn's disease-affected patients). Moreover, intestinal barrier damage is also reflected by increased serum AIF-1 levels in rats with colitis (and in active IBD patients). The existing parallelism between the colitis model and active IBD patients regarding serum/colon AIF-1 levels has a limited value and must be addressed with precaution, since the group of IBD patients is heterogeneous if compare to the type of disease and the administered treatment. A significant increase in AIF-1 expression and mRNA has also been shown in the colon of a TNBS-induced mouse model (Morohashi *et al.* 2003). AIF-1 is a characteristic protein of immune cells that increases during inflammation (Zhao *et al.* 2013).

Our results show that IFX restores the mucosa balance because it reestablishes the mucosal barrier and mucus production and decreases inflammation; IFX reduced dramatically AIF-1-positive immune cells and serum AIF-1 levels in animals with colitis. All these changes observed during the induction correlated well with the observed improvement in the DI in the recovery phase. Moreover, IFX completely restored colon mucosal integrity and reverted colon inflammation, in the recovery phase.

At present, none of the current IBD serological markers can be used by themselves in clinics for diagnosis and follow up; and most of stool markers have only a low-diagnostic performance or have not been sufficiently examined and their clinical role remains unclear (Turkay and Kasapoglu 2010). Our findings suggest that AIF-1 could be a potential UC non-invasive marker. However, additional work must be performed to study, in other experimental models and in patients, the potential correlation between intestinal barrier damage and colon/serum AIF-1 levels.

Currently, we do not know precisely which intracellular mechanism is implicated in the healing process, but our results suggest that p38 is involved. In this direction, several

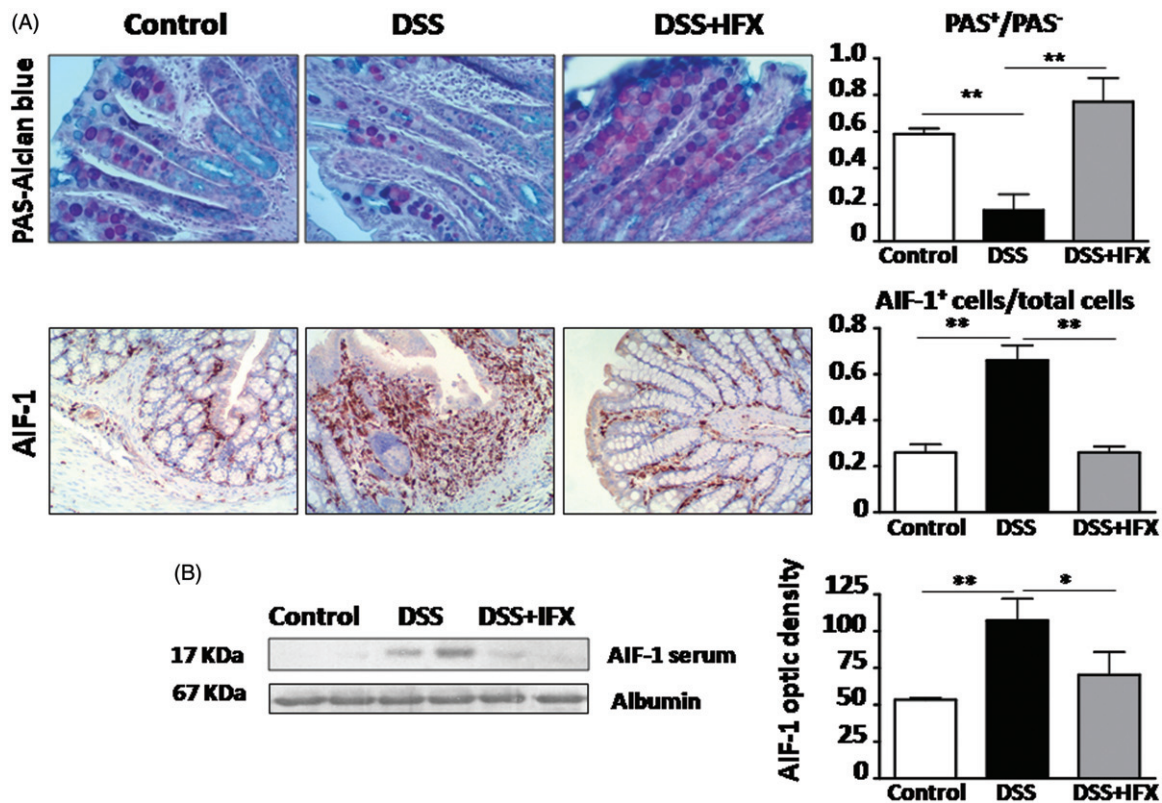


Figure 5. Serum and mucosal markers of intestinal damage in the recovery phase of DSS model. Effect of infliximab. (A) Images of PAS staining and AIF-1 (at 20X magnification). The animals were sacrificed on the fifteenth day (recovery phase) and colon tissue sections were examined. In DSS group: i) PAS staining membranous expression decreased significantly compare to the control and DSS + IFX groups; ii) AIF-1 expression increased in immune cells infiltrated in the lamina propria. The charts illustrate PAS⁺/PAS⁻ or AIF-1⁺ cells/total cells ratios; (B) Western blot analysis was performed to determine serum AIF-1 and albumin levels. Images are representative of four independent experiments. Values are mean \pm SD and data were analyzed by Kruskal–Wallis test with Dunns multiple comparison test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

authors have previously shown a link between AIF-1 expression and p38 activation. Sommerville *et al.* (2009) showed that overexpress AIF-1 produce a constitutive and prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase p38 in rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). They also proof a significant decreased in p38 activation in VSMCs treated with adenovirus aiming to knock down AIF-1 expression (Sommerville *et al.* 2009). Likewise, in breast cancer cell lines, AIF-1-induced phosphorylation of p38 MAPK was inhibited by SB203580, a specific kinase inhibitor (Li *et al.* 2012).

In this article, we have shown that p-p38 is located in the absorptive cell cytoplasm of the colonic glands in control rats, which suggests that it is involved in apoptosis of senescent cells, as it has been previously observed (Basu *et al.* 2014); however, during experimental colitis, p-p38 increased dramatically compare to control animals in the epithelial cells in the tip of the gland. Similarly, the expression of p-p38 in patients with UC correlated with severity of the disease (Zhao *et al.* 2011). IFX treatment of rats decreased p38 phosphorylation in the apical part of the glands, but increased p-p38 staining in the nucleus of cells located in the region of the Lieberkühn crypts in which cells proliferate and/or differentiate. A comparison of these data with the distribution of apoptotic cells (TUNEL staining), dividing cells (PCNA staining) and mucus-producing cells (PAS staining) in the

Lieberkühn crypts, suggests that the activation of p38 has a dual role. In the apex of the crypt, p38 activation leads to apoptosis, whereas in the base and in the middle of the crypt, p38 activation could be involved in the healing process after IFX treatment. The role of p38 in apoptosis during inflammation is very well documented (Kim *et al.* 2014). However, the activation of phospho-p38 during IFX treatment was unexpected and could be explained by some data about the role of p38 in epithelial cell differentiation. p38 has emerged as a key modulator of differentiation along the crypt-villous axis in the intestinal epithelium (Houde *et al.* 2001, Laprise *et al.* 2002, Keely and Barrett 2003, Hokari *et al.* 2005, Otsuka *et al.* 2010). It must be emphasized that the phosphorylated form of p38 interacts directly with transcription factors, such as homeobox CDX2, which is essential in the differentiation of cells along the colonic crypt-villous axis (Houde *et al.* 2001).

In summary, our results suggest that p38 is involved in the intracellular mechanism implicated in the mucosal healing process induced by IFX treatment. Moreover, the discovery of new serum/histological markers can be useful for the prognosis of disease development. In this regard, the existing correlation between intestinal barrier damage and colon/serum AIF-1 levels suggests that AIF-1 could be a potential UC noninvasive marker. However, additional studies must be

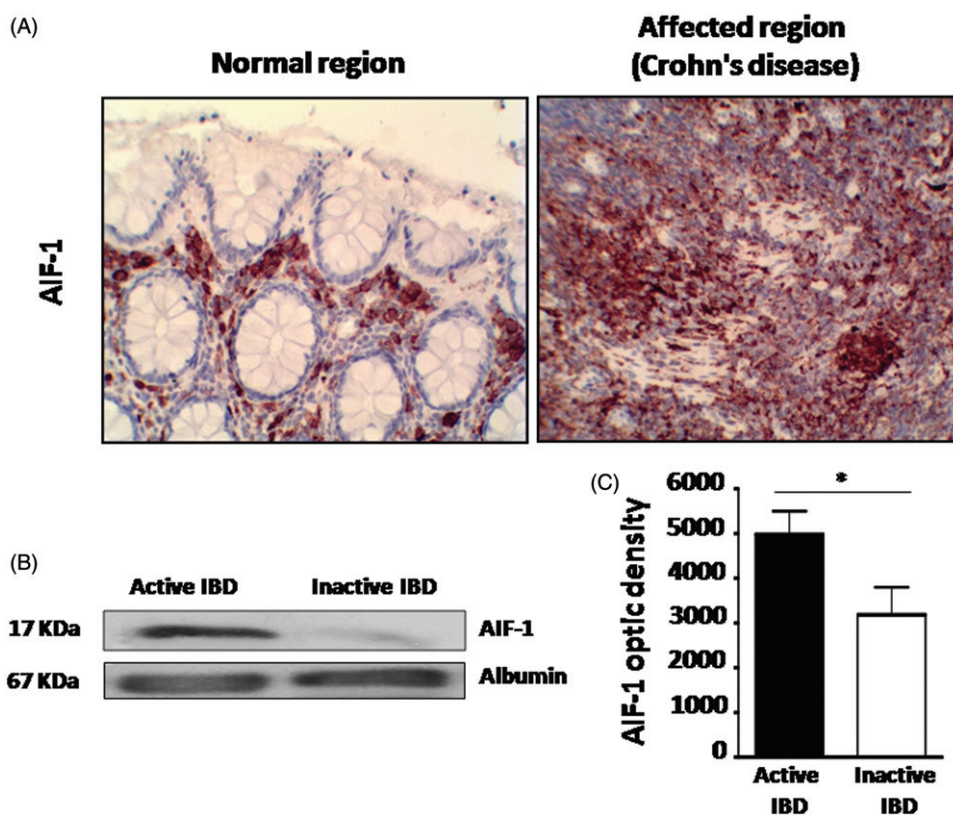


Figure 6. Serum and mucosal marker of intestinal damage in IBD patients. (A) Representative images of AIF-1 staining (at 200 \times magnification) corresponding to healthy adjacent tissue (left) and to a Crohn's disease affected region (right). In the affected tissue, the number of positive AIF-1 cells increased. (B) Western blot analysis was performed to determine serum AIF-1 and albumin levels from active and inactive IBD patients. (C) Optical density values from serum AIF-1 levels are shown as mean \pm SD and data were analyzed T-student (* $p < 0.05$). Images are representative from all the patients.

performed to analyze this potential correlation in other experimental models and in a larger sample size of IBD patients.

Acknowledgments

We thank the Centro de Experimentación Animal (CEA), University of Alcalá, for animal care. The authors also thank Dr. Marta Galán for linguistic assistance.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

Funding

This study was supported by the Universidad de Alcalá/Comunidad de Madrid [CCG10-UAH/BIO-5971 and UAH2011/BIO-007] and the Comunidad de Madrid [S2010/BMD-2423].

References

- Arnott, I.D., McNeill, G., and Satsangi, J., 2003. An analysis of factors influencing short-term and sustained response to infliximab treatment for Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 17 (12), 1451–1457.
- Basu, N., et al., 2014. Intestinal cell proliferation and senescence are regulated by receptor guanylyl cyclase C and p21. *The Journal of Biological Chemistry*, 289 (1), 581–593.
- Cano-Martínez, D., et al., 2014. Effect of infliximab in oxidised serum albumin levels during experimental colitis. *Biomarkers*, 19 (8), 693–701.
- Colombel, J.F., et al., 2011. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 141 (4), 1194–1201.
- Dubinsky, M.C., et al., 2010. Genome wide association (GWA) predictors of anti-TNF α therapeutic responsiveness in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 16 (8), 1357–1366.
- Di Sabatino, A., et al., 2010. Peripheral regulatory T cells and serum transforming growth factor- β : relationship with clinical response to infliximab in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16 (11), 1891–1897.
- Essers, J., et al., 2005. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Molecular and cellular biology*, 25 (21), 9350–9359.
- Fasanmade, A.A., et al., 2009. Population pharmacokinetic analysis of infliximab in patients with ulcerative colitis. *European journal of clinical pharmacology*, 65 (12), 1211–1228.
- Gilks, C.B., et al., 1988. Simple procedure for assessing relative quantities of neutral and acidic sugars in mucin glycoproteins: its use in assessing cyclical changes in cervical mucins. *Journal of clinical pathology*, 41 (9), 1021–1024.
- Hokari, R., et al., 2005. Vasoactive intestinal peptide upregulates MUC2 intestinal mucin via CREB/ATF1. *American journal physiology-gastrointestinal and liver physiology*, 289 (5), G949–G959.
- Hollenbach, E., et al., 2005. Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. *Journal of biological chemistry*, 280 (15), 14981–14988.
- Hommes, D., et al., 2002. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology*, 122 (1), 7–14.

- Houde, M., et al., 2001. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *Journal biological chemistry*, 276 (24), 21885–21894.
- Hounnou, G., et al., 2002. Anatomical study of the length of the human intestine. *Surgical and radiologic anatomy*, 24(5), 290–294.
- Ito, R., et al., 2006. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clinical and experimental immunology*, 146 (2), 330–338.
- Jobin, C., et al., 1999. TNF receptor associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *Journal of immunology*, 162 (8), 4447–4454.
- Keely, S.J. and Barrett, K.E., 2003. p38 mitogen-activated protein kinase inhibits calcium-dependent chloride secretion in T84 colonic epithelial cells. *American journal of physiology-cell physiology*, 284 (2), C339–C348.
- Kim, K.M., et al., 2014. Sasa quelpaertensis leaf extract suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting the proinflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *Nutrition research*, 34 (10), 894–905.
- Klotz, U., Teml, A., and Schwab, M., 2007. Clinical pharmacokinetics and use of infliximab. *Clinical pharmacokinetics*, 46 (8), 645–660.
- Komatsu, M., et al., 2001. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clinical chemistry*, 47 (7), 1297–1301.
- Laprise, P., et al., 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *The journal of biological chemistry*, 277 (10), 8226–8234.
- Li, T., et al., 2012. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer cell migration by up-regulated TNF- α via activate p38 MAPK signaling pathway. *Breast cancer research and treatment*, 131 (3), 891–898.
- Lopetuso, L.R., et al., 2013. Locally injected infliximab ameliorates murine DSS colitis: differences in serum and intestinal levels of drug between healthy and colitic mice. *Digestive and liver disease*, 45 (12), 1017–1021.
- Miheller, P., et al., 2012. Anti-TNF trough levels and detection of antibodies to anti-TNF in inflammatory bowel disease: are they ready for everyday clinical use? *Expert opinion on biological therapy*, 12 (2), 179–192.
- Milia, A.F., et al., 2009. TNFalpha blockade prevents the development of inflammatory bowel disease in HLA-B27 transgenic rats. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13 (1), 164–176.
- Molodecky, N.A., et al., 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142 (1), 46–54.
- Morohashi, T., et al., 2003. Allograft inflammatory factor-1 regulates trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Immunology*, 110 (1), 112–119.
- Nikolaus, S. and Schreiber, S., 2007. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 133 (5), 1670–1689.
- Nishimura, T., et al., 2008. FR167653, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, aggravates experimental colitis in mice. *World journal gastroenterology*, 14 (38), 5851–5856.
- O'Connor, P.M., et al., 2010. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel disease*, 16 (8), 1411–1420.
- Oh, S.Y., et al., 2014. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. *International journal of molecular medicine*, 33 (2), 333–340.
- Otsuka, M., et al., 2010. Distinct effects of p38alpha deletion in myeloid lineage and gut epithelia in mouse models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 138 (4), 1255–1265.
- Peyrin-Biroulet, L., et al., 2008. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 6 (6), 644–653.
- Pincheira, R., et al., 2008. Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity. *Journal of immunology*, 181 (2), 1288–1298.
- Rosenstiel, P., et al., 2005. Differential modulation of p38 mitogen activated protein kinase and STAT3 signalling pathways by infliximab and etanercept in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *Gut*, 54 (2), 314–316.
- Rutgeerts, P., et al., 2005. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *The New England journal of medicine*, 353 (23), 2462–2476.
- Schepp-Berglind, J., et al., 2012. Complement-dependent injury and protection in a murine model of acute dextran sulfate sodium-induced colitis. *Journal of immunology*, 188 (12), 6309–6318.
- Schreiber, S., et al., 2006. Oral p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with BIRB 796 for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 4 (3), 325–334.
- Shah, S.C., et al., 2016. Mucosal healing is associated with improved long-term outcomes of patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology*, S1542–S3565 (16), 00107–5.
- Shi, X.Z., Winston, J.H., and Sarna, S.K., 2011. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *American journal physiology-gastrointestinal and liver physiology*, 300 (1), G41–G51.
- Solomon, L., et al., 2010. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comparative clinical pathology*, 19 (3), 235–239.
- Sommerville, L.J., et al., 2009. Inhibition of allograft inflammatory factor-1 expression reduces development of neointimal hyperplasia and p38kinase activity. *Cardiovascular research*, 81 (1), 206–215.
- Ternant, D., et al., 2006. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Therapeutic drug monitoring*, 28 (2), 169–174.
- Turkay, C. and Kasapoglu, B., 2010. Noninvasive methods in evaluation of inflammatory bowel disease: where do we stand now? An update. *Clinics (Sao Paulo)*, 65 (2), 221–231.
- Vermeire, S., et al., 2002. Demographic and clinical parameters influencing the short-term outcome of anti-tumor necrosis factor (infliximab) treatment in Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*, 97 (9), 2357–2363.
- Waetzig, G.H., et al., 2003. Differential p38 mitogen-activated protein kinase target phosphorylation in responders and nonresponders to infliximab. *Gastroenterology*, 125 (2), 633–636.
- Waetzig, G.H., et al., 2002. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *The journal of immunology*, 168 (10), 5342–5351.
- Zhao, X., et al., 2011. Evaluation of p38 MAPK pathway as a molecular signature in ulcerative colitis. *Journal of proteome research*, 10 (5), 2216–2225.
- Zhao, Y.Y., Yan, D.J., and Chen, Z.W., 2013. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. *Cell immunology*, 284 (1–2), 75–83.

CAPÍTULO II. EFECTO DEL IFX EN LOS NIVELES DE ALBÚMINA OXIDADA SÉRICA DURANTE LA COLITIS EXPERIMENTAL

En este segundo trabajo que compone la tesis doctoral se va a estudiar el efecto del IFX, un fármaco anti-TNF- α ampliamente utilizado en el tratamiento de la EII, sobre los niveles de albúmina oxidada sérica durante la colitis experimental en la fase de inducción.

La EII se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo [*Piechota-Polanczyk & Fichna 2014*], el cual podría afectar a la oxidación de compuestos biológicos que forman nuestro cuerpo [*Rezaie et al 2007*], como por ejemplo las proteínas plasmáticas.

La albúmina es la proteína mayoritaria presente en el suero, entre sus funciones fisiológicas destacan la regulación de la presión osmótica, la unión y el transporte de moléculas endógenas y exógenas, y además actúa como antioxidante plasmático [*Roche et al 2008*]. La hipoalbuminemia es común en pacientes con EII [*Driscoll & Rosenberg 1978*], por esta razón, los niveles de albúmina forman parte del índice de Seo, el cual está constituido en parte por parámetros bioquímicos [*Seo et al 1992*]. Recientemente, la albúmina, junto a la PCR y la calprotectina fecal, se sitúan como los mejores test no invasivos para determinar el riesgo del paciente en edad pediátrica y así evitar un endoscopía en pacientes con bajo riesgo [*Holtman et al 2016*].

En un ambiente celular con estrés oxidativo, los radicales libres de oxígeno generan muchas proteínas modificadas. Se ha documentado un aumento de productos avanzados de oxidación de proteínas en la EII [*Krzystek-Korpacka et al 2008*], los cuales se les ha relacionado con síntomas de la EII [*Wu et al 2015*]. Sin embargo, estos productos son múltiples y complejos, a pesar de ello, la carbonilación de proteínas es una de las formas mejor caracterizadas y aporta evidencias de la extensión del daño oxidativo [*Robinson et al 1999*]. Además, se ha demostrado que los antioxidantes previenen el daño tisular en la colitis experimental [*Keshavarzian et al 1992*] y fármacos como la mesalazina, un antioxidante, son utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de la colitis [*Gionchetti et al 1991*]. En relación a esto, nuestro grupo de investigación determinó una mejora clínica en pacientes con CU cotratados con mesalazina y N-acetil-L-cisteína (NAC) [*Guijarro et al 2008*]. El

NAC es un profármaco que presenta capacidad antioxidante ya que reacciona con los radicales libres y restaura el glutatión reducido [*Dhouib et al 2016*].

Dados los antecedentes señalados pensamos que sería de interés el estudio del efecto del estrés oxidativo que se observa en la colitis experimental sobre la oxidación de las proteínas y de los lípidos, valorando la oxidación de la albúmina y los niveles de malondialdehído que es el producto final de la peroxidación lipídica. Así mismo, estudiamos el efecto del tratamiento con IFX de ratas con colitis experimental sobre los parámetros anteriores.

Con el fin de evaluar si la oxidación de la albúmina puede ser un marcador biológico de la EII, determinamos la oxidación que sufren distintos componentes biológicos del suero y de la mucosa del colon en la colitis experimental, y el efecto del IFX sobre la misma. Asimismo se estudió la oxidación de la albúmina producida por hepatocitos en cultivo, HepG2, en presencia de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-6, las cuales se observó que aumentan durante la EII [*Gross et al 1991*].

Para desarrollar los objetivos propuestos, en un primer lugar se caracterizó el modelo de colitis experimental en ratas mediante la valoración del peso del animal, la diarrea y el sangrado rectal, dichos parámetros se incluyeron en un índice de actividad que permite valorar la enfermedad. El suero recogido cuando fueron sacrificados los animales fue utilizado para determinar distintos parámetros bioquímicos mediante un analizador hematológico, así como para la detección mediante ELISA de los niveles de fármaco y de citocinas y quimiocinas relacionadas con la inflamación como la IL-1- α , IL-4, IL-17, MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1), IFN- γ y TNF- α .

Las ratas tratadas con DSS desarrollaron una colitis consistente en una diarrea sanguinolenta y con una significativa pérdida de peso del animal. El tratamiento con IFX no revirtió esta situación, como así refleja el índice de actividad de la enfermedad. Sin embargo, este modelo desarrolla una forma aguda de colitis útil para determinar nuevos marcadores de estrés oxidativo y su respuesta a IFX.

El grupo de animales tratados con DSS presentaron un aumento significativo del TNF- α sérico, el cual se redujo con la administración de IFX. Los niveles séricos de IFX obtenidos en ratas tratadas fueron similares a los valores séricos en humanos descritos en la literatura (*Ternant et al 2006*).

Como se ha indicado anteriormente, en este modelo de colitis se genera una gran cantidad de estrés oxidativo. Nuestros resultados demuestran que esto incrementa la oxidación de la albúmina, proteína mayoritaria del suero, y que dicha oxidación se reduce con el tratamiento con IFX. La disminución de la oxidación de las proteínas con el tratamiento con IFX también afecta al colon, región donde se produce una mayor inflamación. Estos resultados sugieren que la albúmina oxidada pueda tener relevancia fisiopatológica debido a la fuerte de correlación lineal ($r = 0,84$) existente entre dicho parámetro y los niveles de TNF- α en los animales estudiados.

Actualmente, no se sabe la fuente de radicales libres que producen la oxidación de la albúmina. Sin embargo, pensamos que pueden tener un origen primario producido por la infiltración de neutrófilos y otras células del sistema inmune en la zona intestinal afectada, y que producen sustancias reactivas de oxígeno [*Weiss & LoBuglio 1982*], unido a un origen secundario hepático producido como consecuencia de la inflamación intestinal. Los estudios realizados por nosotros sugieren esta última posibilidad. Los hepatocitos al ser tratados con TNF- α e IL-6 producen un incremento en la oxidación de la albúmina.

Aunque desconocemos el mecanismo por el cual se produce la carbonilación de la albúmina, pensamos que es dependiente de TNF- α dado que se revierte parcialmente con IFX. El aumento de la albúmina oxidada se usa como marcador de buen pronóstico de supervivencia en pacientes hemodializados con normoalbuminemia [*Lim et al 2013*], en pacientes con cirrosis hepática [*Oettl et al 2013*], y en pacientes con fallo renal [*Mera et al 2005*].

Se sabe que la albúmina tiene la capacidad de unir metales de transición, particularmente cobalto y cobre. Modificaciones en el extremo N-terminal de la albúmina provocan baja capacidad de unir cobalto. Un estudio piloto demostró que este hecho es útil para el diagnóstico del síndrome coronario agudo [*Stejskal et al 2004*]. La determinación de la albúmina modificada durante una isquemia, IMA (albúmina modificada por isquemia), se utiliza como biomarcador clínico [*Wu 2003*]. Sin embargo, la albúmina está modificada en

otras patologías como en el cáncer, la enfermedad hepática y renal [Johnston et al 2004]. Recientemente, se ha demostrado que pacientes con EII presentan niveles de IMA significativamente mayores que en sujetos sanos, y se encuentra correlacionado positivamente con el índice de actividad de la enfermedad [Kaplan et al 2015]. Además, en los últimos tiempos se han desarrollado medidas cuantitativas para determinar la oxidación de la albúmina mediante HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) y por métodos espectroscópicos, así como su caracterización estructural [Annibal et al 2015] [Takahashi et al 2016].

La identificación y validación de nuevos biomarcadores séricos que se correlacionen con signos y síntomas de la EII son de gran utilidad en la práctica clínica, así como en la evolución de nuevos medicamentos en los correspondientes ensayos clínicos. Nuestros resultados junto con otros realizados en pacientes con EII [Kaplan et al 2015] sugieren que la albúmina oxidada podría ser considerada como un candidato para ser un biomarcador de la EII.

RESEARCH ARTICLE

Effect of Infliximab in oxidised serum albumin levels during experimental colitis

David Cano-Martínez¹, Irene D. Román¹, M. Val T. Lobo², Oscar Pastor¹, Irene Moreno-Villena¹, Alberto Paradela³, Borja Hernández-Breijo¹, M^a Dolores Fernández-Moreno¹, Jorge Monserrat⁴, Patricia Sanmartín-Salinas¹, Javier P. Gisbert⁵, and Luis G. Guijarro¹#

¹Department of Systems Biology, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain, ²Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain, ³Proteomic Service, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain, ⁴Department of Medicine, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain, and ⁵Gastroenterology Unit, Hospital Universitario de La Princesa and Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, Spain

Abstract

Infliximab (IFX) is widely used in ulcerative colitis and in Crohn's disease treatment. Both diseases are characterised by increased oxidative stress, which may affect albumin oxidation. In order to test this hypothesis, the effect of IFX on colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) in rats was evaluated by measuring the Disease Activity Index, biochemical parameters, serum albumin oxidation and colonic mucosa oxidation. Rats with colitis showed an increase in oxidised serum albumin levels and in the oxidation of colon mucous cells. Both decreased after IFX treatment. This suggests that oxidised albumin could be a useful biomarker for monitoring inflammatory bowel disease.

Keywords

Biomarker, carbonylated albumin, dextran sulfate sodium, inflammatory bowel disease

History

Received 18 September 2014

Revised 23 October 2014

Accepted 27 October 2014

Published online 10 November 2014

Introduction

The assessment of inflammatory bowel disease (IBD) activity relies on clinical parameters (such as diarrhoea, abdominal pain, urgency of defecation and blood in faeces) and in laboratory markers (i.e. albumin, haemoglobin, C-reactive protein, fibrinogen, faecal α 1-antitrypsin, faecal calprotectin, faecal myeloperoxidase, faecal lactoferrin and leukocyte and platelet counts) (Masoodi et al., 2011; Staros, 2003). Due to the multiplicity of IBD disease symptoms, more than 20 indices for IBD have been developed for use in clinical trials (D'Haens et al., 2007). Recently, a clinical index (Simple Clinical Colitis index), a composite clinical and endoscopic index (Mayo Clinic index) and a composite clinical and biomarker index (Seo index) were compared (Walsh et al., 2014). The conclusion was that no perfect index exists and that the inclusion of measurable biomarkers in a composite index would facilitate comparison between clinical trials. The highest correlation coefficients between IBD symptoms and biomarkers were for fecal α 1-antitrypsin ($r = 0.82$) and serum

albumin ($r = 0.80$) (Moran et al., 1995). During colonic inflammation, albumin is lost in faeces and decreases in serum of poor nutritional status (Colombo et al., 2012). Ideally, a disease biomarker that could easily be adopted in daily clinical practice should be able to identify people at risk for a given disorder and correlate well with disease activity. Unfortunately, there is no such disease marker for IBD.

Numerous factors are involved in the aetiopathology of IBD, such as overproduction of proinflammatory mediators, including cytokines and chemokines, neutrophil infiltration, dysfunction of the immune system and microflora imbalance (Christophi et al., 2012). To a greater or lesser extent, all these factors cause oxidative burst. Many authors consider oxidative stress as a major factor in the pathogenesis of IBD and consider that it may underlie the initiation and perpetuation of the disease (Achitei et al., 2013). In this regard, we have demonstrated the beneficial effects of the addition of an antioxidant agent, N-acetyl-L-cysteine, to mesalamine for the treatment of human ulcerative colitis (Guijarro et al., 2008), while other authors have found the same effect in experimental colitis (Siddiqui et al., 2006). A Phase II Clinical trial is ongoing to prove the “free radical hypothesis” of ulcerative colitis (NCT01586533). The mechanism by which oxygen-free radicals generate protein modifications is complex and still lacks adequate definition. However, protein carbonylation is well characterised and provides a good estimate of the extent of oxidative damage to proteins (Bargagli et al., 2007).

#Dr Luis G. Guijarro is responsible for statistical design/analysis. E-mail: luis_guijarro@telefonica.net

Address for correspondence: Dr Luis G. Guijarro, Department of Systems Biology, Universidad de Alcalá, 28871, Alcalá de Henares, Spain. Tel: +34 91 885 4865. Fax: +34 91 885 4585. E-mail: luis_guijarro@telefonica.net

In order to test whether albumin oxidation might be a useful biomarker in the evaluation of IBD, we examined the carbonylation of serum albumin and of colonic mucosa proteins during DSS-induced colitis and under co-treatment with Infliximab (IFX).

Materials and methods

Animals and treatment

Male Wistar rats weighing 180 to 200 g were housed under conditions of controlled temperature and light in the Animal House of the University of Alcalá. The animals were handled according to the criteria outlined in the “Guide to the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institute of Health. The animals were randomised into three groups: healthy rats (Control group) and rats subjected to experimental colitis, without (DSS group) or with Infliximab treatment (DSS + IFX group). We induced colonic inflammation by oral administration of 5% dextran sulphate sodium (DSS; MP Biomedicals, Strasbourg, France) for 6 days in drinking water (Suzuki et al., 2004). The control rats consumed drinking water. One group of rats with colitis was also treated with Infliximab (IFX), an anti-TNF- α antibody. IFX (5 mg/kg, i.p.) was administered on the first and fifth day. We sacrificed the rats ($n = 3$ –6 per group) on the sixth day and obtained serum and tissue samples from the colon.

Biochemical parameters

To characterise the extent of the disease, serum samples for haematological analysis were collected from the rats at the time of sacrifice. The biochemical parameters were analysed using an ARCHITECT c16000 (Abbott, Madrid, Spain) hematology analyser. The detection of cytokines (IL-1 α , IL-4, IL-17A, MCP-1, IFN- γ and TNF- α) was performed using Rat Cytokine 5plex Kit FlowCytomix and Rat IL-17A FlowCytomix Simplex Kit (eBioscience, Vienna, Austria), following the manufacturer's instructions.

Determination of serum Infliximab levels by ELISA

The determination of serum IFX levels was carried out by ELISA as previously described (Ternant et al., 2006). Readings were taken at 450 nm using a Versamax plate reader (Molecular Devices, St. Grégoire, Cédex). Infliximab serum concentrations were interpolated from the standard curve of the plate by means of different dilutions of purified Infliximab.

Thiobarbituric acid reactive substances assay

One volume of rat serum was mixed with two volumes of 15% trichloroacetic acid (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) and mixed thoroughly in ice. The flocculent precipitate was removed by centrifugation at 2200 rpm (4 °C, for 15 min). The supernatant was mixed with one volume of 0.67% thiobarbituric acid (TBA; Sigma Aldrich). The mixture was heated for 10 min in a boiling water bath and, after cooling, the absorbance was measured at 532 nm. TBARS amounts were quantified by using 1,1,1,3-tetraethoxypropane (Sigma Aldrich) as a standard curve.

Rat serum albumin purification

Rat serum albumin was purified using chromatographic columns filled with Cibacron blue (CB) (Millipore, Madrid, Spain). First, the columns were equilibrated using starting buffer (0.05 M citric acid; 0.1 M Na₂HPO₄; pH 7.0), then the sample was charged in the column. Albumin was eluted from the column using elution buffer (0.05 M KH₂PO₄; 1.5 M KCl; pH 7.0). Eluted samples were concentrated using Amicon ultra centrifugal filters (Millipore, Madrid).

Protein identification by mass spectrometry

In-gel trypsin digestion and the preparation of purified albumin samples were performed as previously described (Gallardo et al., 2013). Modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI) was added at a final concentration of 16 ng/ μ l in 25% ACN/50 mM ammonium bicarbonate solution and the gels were digested at 37 °C for 6 h. The reaction was stopped adding 0.5% TFA for peptide extraction. Tryptic peptides were dried by speed-vacuum centrifugation and re-suspended in 4 μ l of deionised water for the purposes of MALDI TOF/TOF analysis.

For the MALDI-TOF/TOF analysis, the samples were automatically registered in an ABi 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA). The data were analysed using MASCOT software v.2.1 (Matrix Science, London, UK) to search in the non-redundant UniProt/SwissProt protein database.

Histochemistry of oxidized proteins

The proximal colon samples were fixed with neutral formalin, washed with PBS, dehydrated with graded ethanol series and embedded in paraffin. Five micron sections were obtained and mounted on silanised glass slides.

In order to perform the histochemical detection of the carbonyl groups introduced into proteins by oxidative reactions, the OxyBlotTM Detection Kit (Millipore) was used, following the kit's instructions but with some modifications in order to adapt the method for histological purposes. Since non-specific reactions occur when samples are fixed using aldehydes, sections from the formaldehyde-fixed colon samples were deparaffinised and heated in a pressure cooker for 3 min using citrate buffer, as is done for immunohistochemical purposes. After washing with double-distilled water, the carbonyl groups in the protein side chains were derivatised to 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNPH) by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) in 2N HCl for 8 min at room temperature. After washing in TBS, the immunohistochemical detection of DNPH was carried out using the antibody anti-DNPH provided with the kit. No stain was observed when free carbonyl and Schiff bases had been reduced previously by incubating the samples with 25 mM sodium borohydride in 8% methanol for 30 mins. Negative controls were performed by incubating the sections either in 2N HCl without DNP for 8 min before incubation with the primary antibody, or with non-immune rabbit serum instead of the polyclonal anti-DNPH antibody.

Cell culture and Western blot

HepG2 cells were cultured as previously described (Cuevas et al., 2007). The cells were incubated with interleukin-6 (50 ng/ml) and TNF- α (50 ng/ml) for different lengths of time in the presence or absence of infliximab (50 ng/ml). After incubation, procaspase-3/caspase-3, PARP, albumin and protein carbonylation levels were studied by Western blotting.

Biological oxidation assay

The biological oxidation assay was performed using the Oxyblot™ Detection kit (Millipore, Barcelona). The samples (from serum or HepG2 cells) were incubated for 15 min with DNP (2,4-dinitrophenylhydrazine) to obtain derivatised carbonyl protein groups. Western blotting (WB) was performed using the anti-DNP antibody in order to identify the carbonylated groups. The semiquantitative analysis of the carbonyl groups was performed by densitometry of the images obtained by WB, using the program Scion Image (Frederick, MD).

Statistical analysis

The data are presented as the mean \pm SD. One way-ANOVA with the Bonferroni post-testing was used to evaluate differences between the control and experimental groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Assessment of ulcerative colitis in rats, induced by DSS: effect of Infliximab

At the end of the experiments (day 6 of treatment), rats were checked for body weight, stool consistency, blood in stool and biochemical parameters. Our study showed significant differences between the different experimental groups. There was weight loss in animals treated with DSS or with DSS and IFX but not in the control group. The scoring system used to determine the Disease Activity Index (DAI) included weight loss, stool consistency and blood in stools and is described in Table 1. We observed a higher score in the DSS group with respect to the control group, and this was not reversed by IFX treatment (Figure 1).

At the time of sacrifice, serum samples were analyzed to determine biochemical parameters (Table 2).

In DSS plus IFX-treated rats, at experiment end, the serum IFX level reached $120.4 \pm 35.1 \mu\text{g/ml}$, which corresponds to the median infliximab peak concentrations reported in the literature for humans (90–110 $\mu\text{g/ml}$) (Ternant et al., 2006).

Glucose levels decreased in the DSS-treated animals and increased moderately with IFX treatment. However, albumin, calcium and total protein levels did not change significantly in experimental colitis (Table 2).

DSS treatment led to neither hepatotoxicity nor nephrotoxicity as indicated by AST/ALT and creatinine serum levels, respectively. However, the serum level of LDH, a general marker of tissue damage, increased in the DSS group and decreased after the administration of IFX (Table 2).

Moreover, the enzymatic activity of alkaline phosphatase and phosphate levels fell significantly in the rats treated with

Table 1. Scoring system for the disease activity index (DAI).

Score	Weight loss (% of control)	Stool consistency	Blood in stools
0	$X \leq 1$	Normal stool	Normal
1	$1 < x \leq 5$		
2	$5 < x \leq 10$	Loose of consistency	Red anus
3	$10 < x \leq 20$		
4	$20 < x$	Diarrhoea	Gross bleeding

Cano et al. (2014).

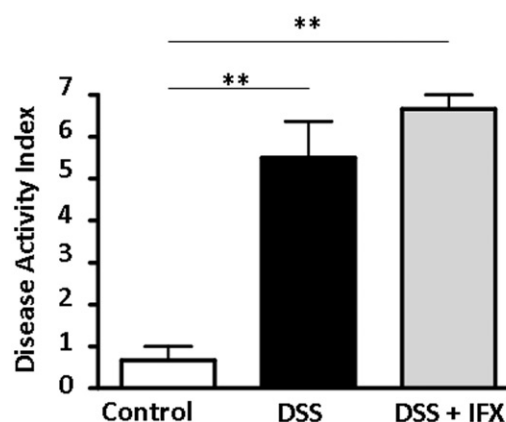


Figure 1. Effect of Infliximab on DAI. DAI was calculated based on body-weight loss, stool consistency and blood in stools. We employed three groups of rats: healthy rats (Control group) and rats subjected to experimental colitis, without (DSS group) or with IFX treatment (DSS + IFX group). Data are the mean \pm SD. Data were analysed by means of ANOVA testing with the Bonferroni post-test (** $p < 0.01$).

DSS, with or without IFX (Table 2). This result is consistent with the decrease in bone mineral content that we detected in the animals with experimental colitis, after Dual X-Ray Absorptiometry (DXA) analysis (data not shown).

Regardless of the presence of IFX, colitis increased the serum urea level by 40% ($p < 0.05$) with respect to the control rats (Table 2); this was probably due to an increased urea synthesis, as previously reported in patients with active IBD (Lundsgaard et al., 1996).

Effect of IFX on serum TNF- α level

We tested the serum levels of cytokines: IL-1 α , IL-4, IL-17A, MCP-1, IFN- γ and TNF- α . Administration of 5% DSS caused TNF- α serum levels (117 %; $p < 0.01$) to rise, whereas the serum levels of the other cytokines tended to rise only in the DSS-treated group, but this was not statistically significant in any case (data not shown). There was a fall in TNF- α levels ($p < 0.001$) in the DSS + IFX group with respect to the DSS group.

Effects of Infliximab on the levels of carbonylated proteins and TBARS in DSS-treated rat serum

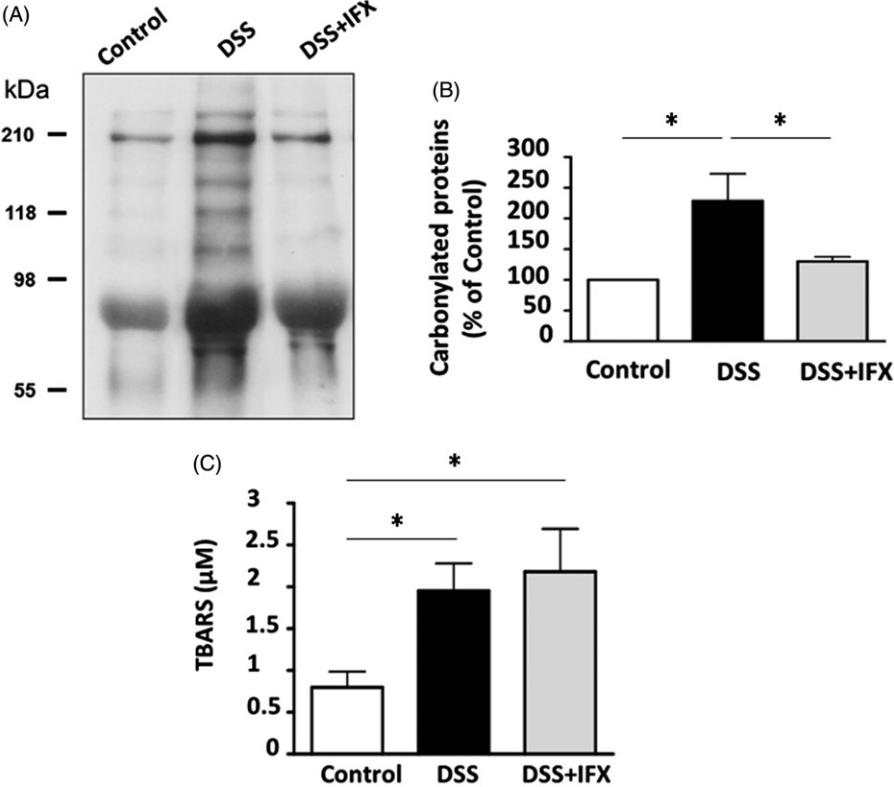
The results show that the serum carbonylated proteins increased in the DSS group and decreased with IFX treatment (Figure 2A and B). However, the oxidation of lipids in serum also increased in DSS rats but IFX treatment was not able to re-establish control values (Figure 2C).

Table 2. Biochemical parameters in serum obtained from rat with colitis induced by DSS. Effect of Infliximab (DSS + IFX) (Cano et al., 2014).

	Control	DSS	DSS + IFX
AST (U/l)	71.0 ± 10.6	50.7 ± 12.3	89.5 ± 4.95
ALT (U/l)	27.7 ± 5.51	27.5 ± 6.76	28.5 ± 0.71
LDH (U/l)	388.0 ± 56.0	924.7 ± 131.5 (*)	585.0 ± 53.7 (*, #)
Alkaline phosphatase (U/l)	220 ± 32.1	149.3 ± 46.0 (*)	144.5 ± 3.54 (*)
Glucose (mg/dl)	184.7 ± 12.4	142.5 ± 15.9 (*)	163.7 ± 6.11 (#)
Albumin (g/dl)	1.23 ± 0.15	1.12 ± 0.05	0.90 ± 0.17 (*)
Phosphate (mg/dl)	9.07 ± 0.30	7.80 ± 0.26 H	7.97 ± 0.46 (*)
Calcium (mg/dl)	9.97 ± 0.11	9.60 ± 0.29	9.20 ± 0.36 (*)
Total proteins (g/dl)	5.53 ± 0.15	5.17 ± 0.21	4.60 ± 0.80 (*)
Creatinine (mg/dl)	0.41 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.46 ± 0.03
Urea(mg/dl)	25.3 ± 2.52	35.5 ± 3.32 (*)	44.0 ± 4.36 (***, #)
TNF-α (pg/ml)	142.9 ± 24.4	310.2 ± 29.5 (**)	28.6 ± 0.7 (***,###)
IFX (Jg/ml)	–	–	120.4 ± 35.1
Diarrhoea	No	Yes	Yes
Bleeding	No	Yes	Yes

Healthy rats (Control group) and rats subjected to experimental colitis, without (DSS group) or with Infliximab treatment (DSS + IFX group). Values are mean ± SD. Data were analyzed by ANOVA test. (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001; Control versus DSS or DSS + IFX) (#*p* < 0.05, ###*p* < 0.001; DSS versus DSS + IFX). AST (aspartate amino transferase); ALT (alanine amino transferase); LDH (lactate dehydrogenase).

Figure 2. Effect of Infliximab on the carbonylated proteins and the oxidation of lipids of rat serum. (A) Rat serum was incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) followed by Western blotting using anti-DNP antibody to identify the carbonylated groups. (B) The chart illustrates the percentage of carbonylated proteins versus control group. Data are the mean ± SD. Data were analysed by means of ANOVA with the Bonferroni post-test (**p* < 0.05). (C) The oxidation lipids from rat serum were detected by TBARS assay. The chart illustrates the TBARS concentration (μM) in: healthy rats (control group) and rats subjected to experimental colitis, without (DSS group) or with Infliximab treatment (DSS + IFX group). TBARS amounts were quantified by using 1,1,1,3-tetraethoxypropane as a standard curve. Data are the mean ± SD. Data were analysed by means of ANOVA with the Bonferroni post-test (**p* < 0.05).



Effect of Infliximab on serum albumin oxidation state during colitis

We used matrix-assisted laser-desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF/MS) and protein carbonyl assays to perform serum albumin oxidation analysis. Albumin had been purified beforehand from rat serum by means of CB column to obtain 99% purity. Different concentrations of purified albumin were loaded in a SDS-PAGE gel and electrophoresis was carried out. The gel was then stained with Coomassie blue. The protein spot (66 kDa)

was excised from the gel (Figure 3A) and its mass fingerprinting was identified by matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF) after trypsin proteolysis. Albumin was identified by the peaks corresponding to the following fragments 169–184 (*m/z*, 2016.03), 348–360 (*m/z*, 1609.79) and 361–372 (*m/z*, 1465.78). The fragmentation profile corresponding to the albumin of control rats and animals with colitis was very similar (Figure 4A and B) except for a new peak of *m/z*, 2472.15 for colitis animals/rats (Figure 4C and D) that could not be identified. In order to investigate the chemical nature of the small changes in albumin

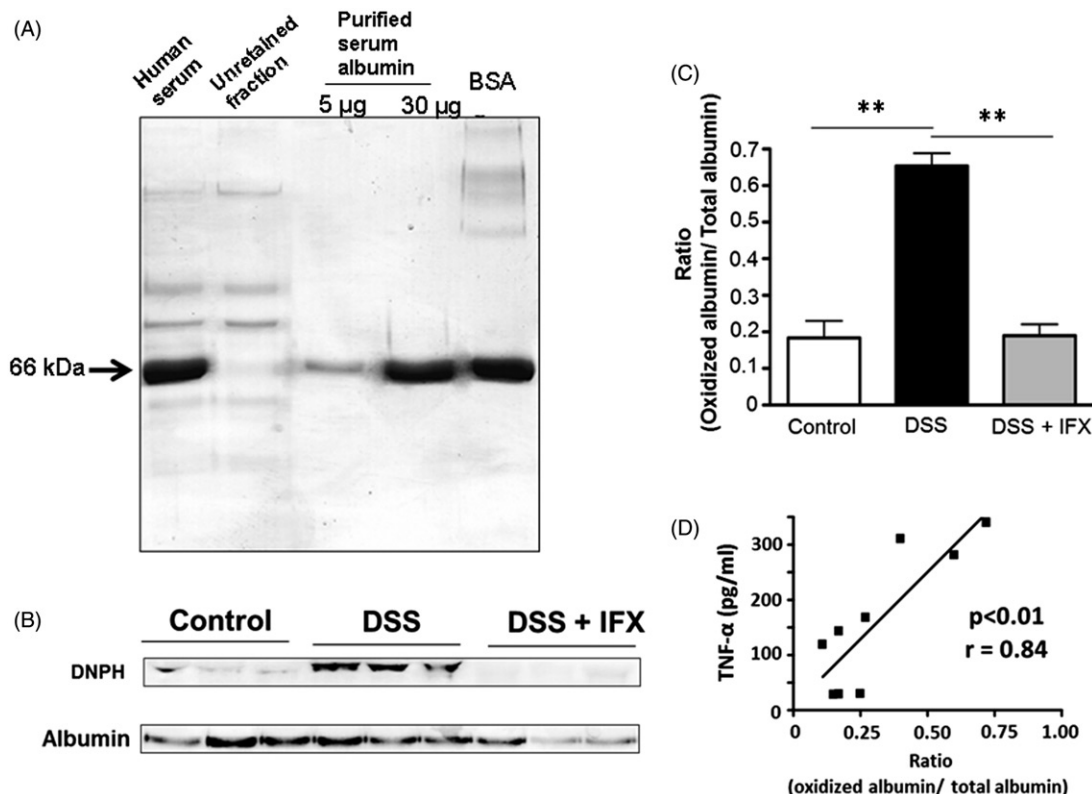


Figure 3. Effect of Infliximab on serum albumin oxidation state. (A) Rat serum albumin was purified in a CB column, loaded on a SDS-PAGE gel and stained with Coomassie blue. (B) After purification of albumin in a CB column, the reactive carbonyl-groups in rat serum albumin and total protein were identified by western blotting using anti-DNPH and anti-albumin antibodies, respectively. (C) Ratio of oxidised albumin/total albumin measured from results of panel B. Healthy rats (Control group) and rats treated with DSS without (DSS group) or with IFX (DSS + IFX group) ($n = 3$). Data are expressed as the mean \pm SD and were analysed by ANOVA testing with the Bonferroni post-test. All experimental groups were compared with DSS (** $p < 0.01$). (D) The graphic shows the correlation between levels of TNF- α serum (pg/ml) and the ratio oxidised albumin/total albumin from the three experimental groups ($r = 0.84$, ** $p < 0.01$).

fragmentation during oxidative stress, we studied the presence of reactive carbonyl-groups in the purified albumin using SDS-PAGE electrophoresis (Figure 3A) and then by Western blot identification using anti-DNPH and anti-albumin antibodies (Figure 3B).

The results showed that the biological oxidation of albumin (ratio oxidised albumin/total albumin) was significantly higher in rats treated with DSS ($p < 0.01$; fold-change ≥ 3.5) than in control rats, with a return to control values after IFX treatment (Figure 3B and C). In addition, there was a good correlation coefficient (Pearson's $r = 0.84$; $p < 0.01$) between the levels of serum TNF- α (pg/ml) and the ratio oxidised albumin/total albumin (Figure 3D).

Effect of Infliximab on protein oxidation of colonic mucosa during colitis

It is commonly accepted that protein carbonylation (oxidised proteins) quantitatively reflects the level of oxidative stress (Dalle-Donne et al., 2003) and may partly lead to cell damage.

In the group of rats treated with DSS, the carbonylation of mucosa proteins from goblet cells was significantly higher than in the control group. IFX treatment did not recover the oxidation state of goblet cells in the colon (Figure 5A and B). However, IFX treatment of sick animals decreased the protein oxidation of cell nuclei present in colonic mucosa with respect to untreated animals with colitis (Figure 5A and C).

Effect of Infliximab on the oxidation of the albumin produced by hepatocytes in inflammatory conditions

In order to ascertain whether the origin of the oxidised albumin observed during colitis could be liver inflammation, we used an *in vitro* model to reproduce such inflammation. The HepG2 lines are clearly differentiated hepatocytes, obtained from a human hepatoblastoma, which respond to inflammatory conditions by producing albumin and acute phase proteins. We mimicked liver inflammation by incubating the cells with TNF- α and interleukin-6. In the presence of both these proinflammatory cytokines, we observed an increase of carbonylated proteins over time. Co-treatment with IFX at 24 h partially reversed this process (Figure 6A). At this time, TNF- α and interleukin-6 caused a slight rise in cell apoptosis, which was reversed by the presence of IFX (Figure 6B). Apoptosis was followed by caspase-3 production and PARP fragmentation. With the aid of Cibacron blue (CB), we were able to isolate albumin of great purity (Figure 6C). After using Western blot techniques to analyse the previously purified fractions, we observed that the albumin produced by HepG2 cells (Figure 6D, left) was more carbonylated than commercial albumin (Figure 6D, right). Finally, we demonstrated that HepG2 cells incubated in proinflammatory conditions (in presence of TNF- α and interleukin-6) produced more oxidised albumin than control, a state of affairs which was partially reversed after co-treatment with IFX (Figure 6E).

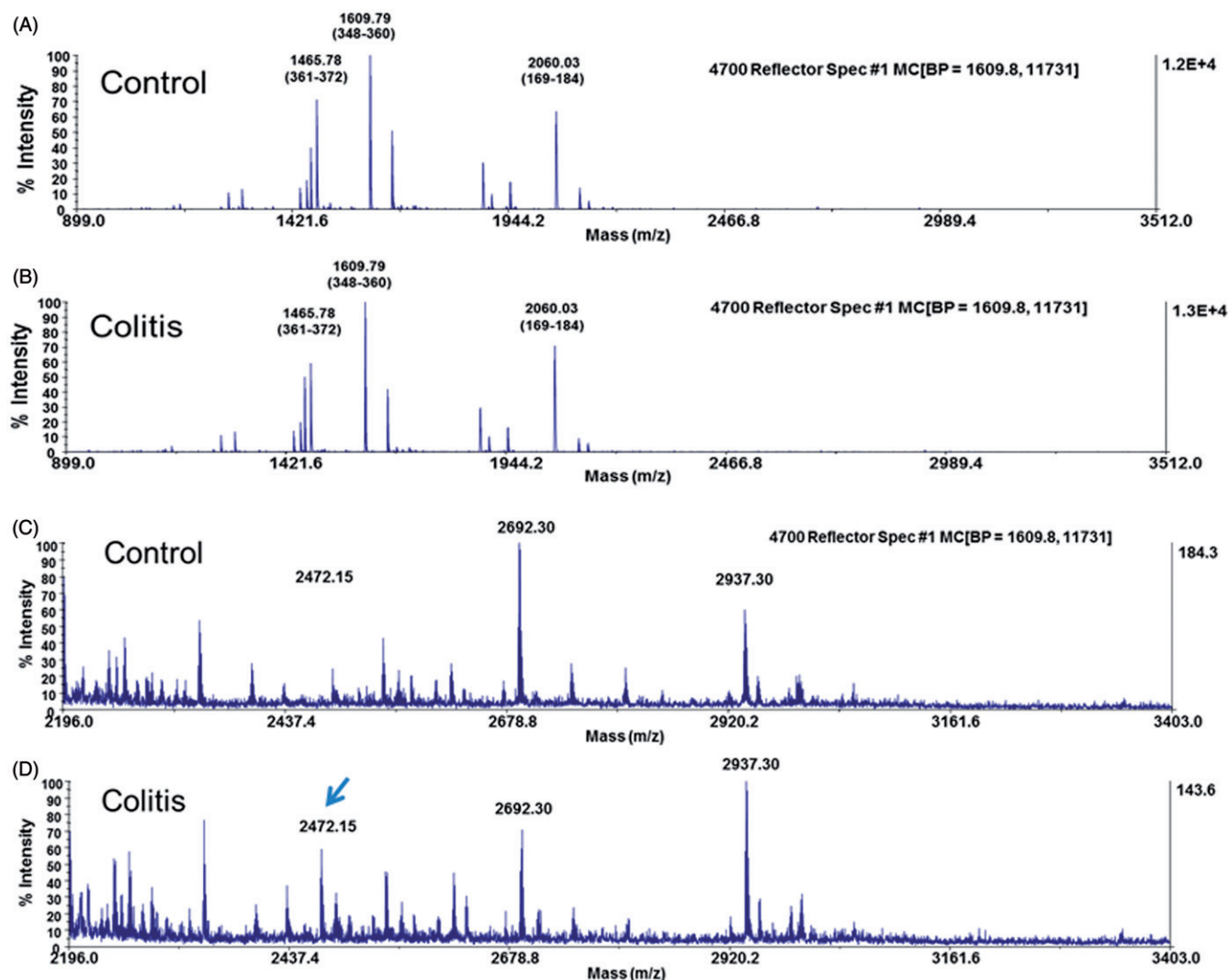


Figure 4. Effect of experimental colitis on the tryptic fragments of rat serum albumin. Serum albumin analysis by spectrometry mass/mass spectrometry (MALDI TOF/TOF). (A and C) Control group. (B and D) DSS group.

Discussion

In this paper, we identified oxidised albumin in serum as a potential biochemical marker of experimental colitis. Our conclusion is based primarily in the positive correlation between this parameter and the levels of TNF- α in serum during experimental colitis. High doses of DSS (5%) over a short period of time induced an acute form of colitis that was characterised by body weight loss, colonic shortening and blood in faeces that resembled inflammatory bowel disease (Shi et al., 2011). This “acute” model is very useful for identifying new protein biomarkers of oxidative stress and their response to IFX treatment. In our conditions, the administration of IFX did not attenuate either the macroscopic signs of colitis, summarised in the disease activity index (DAI), or biochemical alterations. In fact, the sick rats treated with IFX had lower levels of calcium, total proteins and albumin in serum than untreated animal with colitis. The low levels of serum proteins correlated well with the increase in serum urea levels, which suggests accelerated protein turnover in sick animals treated with IFX. In this connection, an accelerated catabolism of proteins has been observed in active IBD patients (Lundsgaard et al., 1996). Our results

suggest that IFX increases this process in the “acute” model, resulting in the augmentation of urea synthesis by the liver.

As albumin is the most abundant protein in serum, it is a very good marker of intestinal inflammation and/or malnutrition. Our results show that in experimental colitis this protein is more carbonylated than in healthy animals, which suggests an increase of oxidative stress in this pathological condition. Carbonylated-albumin (CA) could belong to the family of the advanced oxidation protein products (AOPPs) recently shown to be involved in Crohn’s disease (Krzystek-Korpaczka et al., 2008). AOPPs are dityrosine-containing cross-linked proteins mainly formed by the reaction of plasma proteins with chlorinated compound. It has been demonstrated recently that AOPP-albumin (prepared by incubating rat serum albumin with hypochlorous acid) has pro-inflammatory properties in the intestinal epithelium when administered to normal rats (Xie et al., 2014). Not only is AOPP-albumin found in the villous epithelial cells of treated rats, but also AOPPs deposits are elevated in subjects with active Crohn’s disease (Krzystek-Korpaczka et al., 2008). In this study, we have shown that IFX treatment restores CA levels, which indicates that this change is dependent of TNF- α levels. At present, we do not know the clinical relevance of CA to

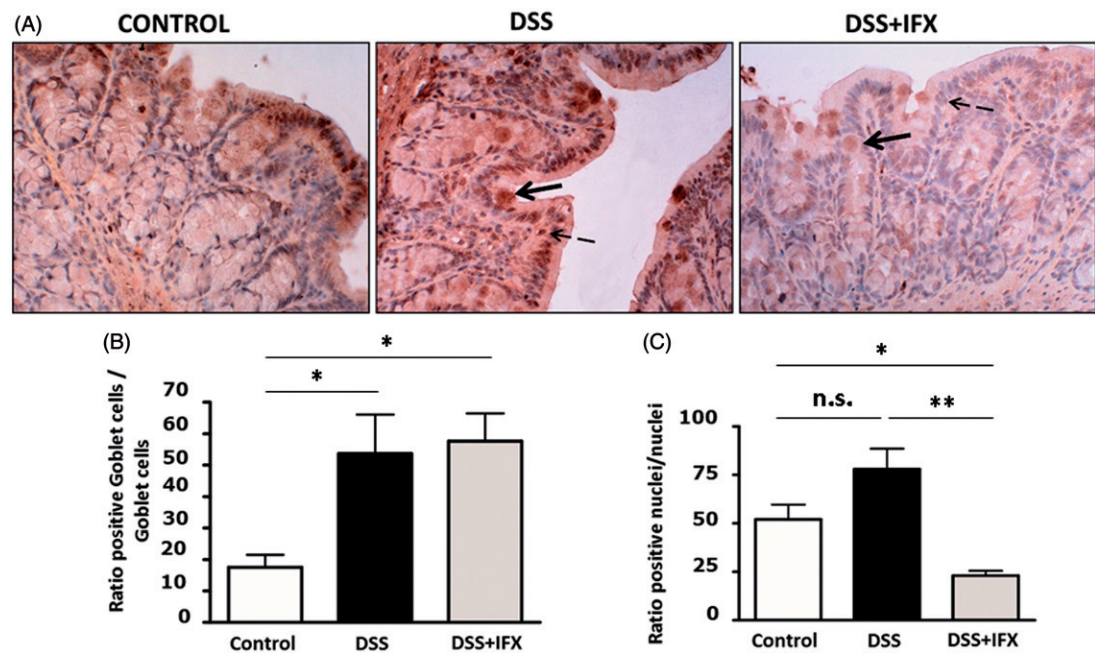
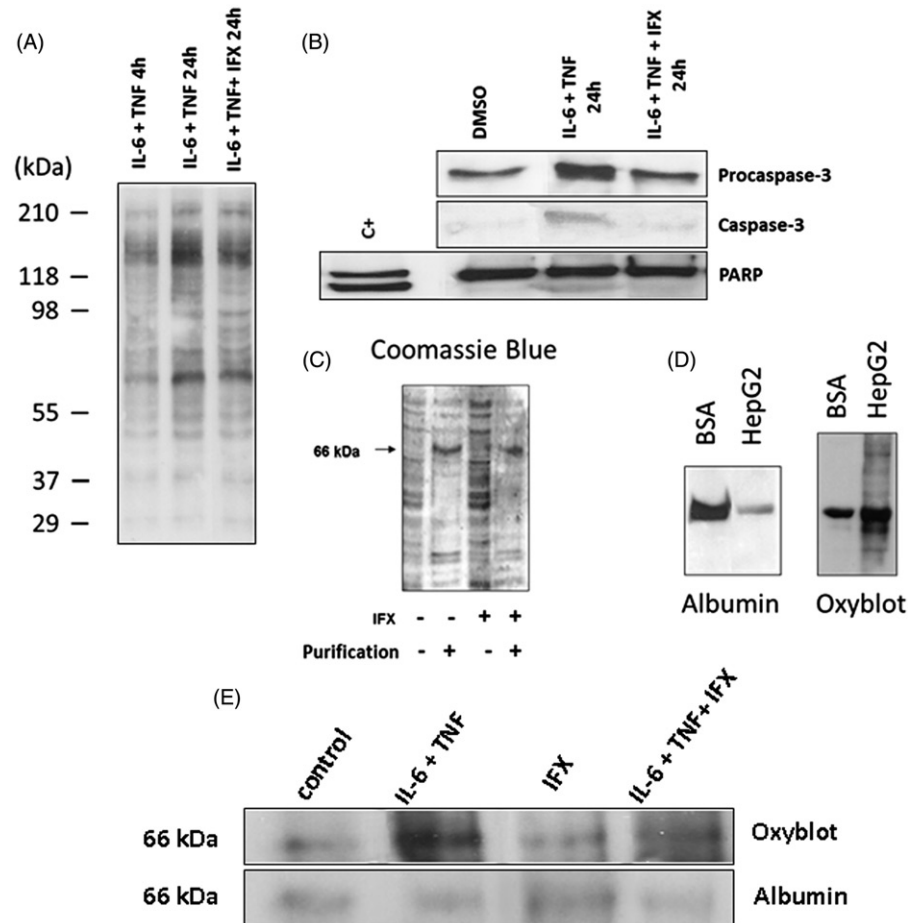


Figure 5. Immunostaining of DNP. Effect of Infliximab. (A) Immunohistochemical staining of DNP (at 20 \times magnification). The images are representative of four colon sections in each experimental group: healthy rats (Control group) and rats subjected to experimental colitis, without (DSS group) or with Infliximab treatment (DSS + IFX group). In the DSS group, the continuous arrow indicates oxidised proteins in goblet cells, the discontinuous arrow oxidation in the epithelial cells nucleus. The charts show the number of oxidised goblet cells (B) or oxidised nuclei (C) per field by observing 100 cells in randomly selected fields. Values are expressed as the mean \pm SD and were analysed by ANOVA testing with the Bonferroni post-test (* p < 0.05, ** p < 0.01). n.s. = not significant.

Figure 6. HepG2 cells treated with proinflammatory cytokines. Effect of Infliximab. Cells were treated with interleukin-6 (50 ng/ml) plus TNF- α (50 ng/ml) for 4 h or 24 h, with or without IFX (50 ng/ml). (A) Biological oxidation assay from cell samples was performed by incubating with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) followed by Western blotting using anti-DNP antibody to identify the carbonylated groups. (B) Western blotting of procaspase-3, caspase-3 and PARP from cell samples, at 24 h of cytokines treatment. C+ = Positive control for apoptosis. (C) Electrophoresis of proteins from HepG2 cells, stained with Coomassie blue. Cellular cultures were treated with proinflammatory cytokines (interleukin-6 and TNF- α), in the presence or absence of IFX and submitted or not to a purification process with CB column. (D) Western blotting of albumin of commercial origin and isolated albumin from HepG2 cells (left); western blotting of carbonylated groups in albumin of commercial origin and in isolated albumin from HepG2 cells (right). (E) Carbonylated groups in albumin isolated from HepG2 cells subjected to proinflammatory conditions (interleukin-6 and TNF- α), with or without IFX co-treatment.



IBD, but we suspect that it may be important since oxidised albumin leads to neutrophil activation and the aggregation of platelets and erythrocytes *in vitro* (Levin & Egorihina, 2013; Michelis et al., 2013), while the same is not true of IBD. In other diseases, serum CA has proven to be a good predictor of the survival of normoalbuminemic hemodialysed patients (Lim et al., 2013), of patients with liver cirrhosis (Oettl et al., 2013) and of patients with kidney failure (Mera et al., 2005). At present, we do not know the mechanism involved in the oxidation of albumin, but we should bear in mind that IBDs are a group of pathologies characterised by an increase in oxygen-free radicals (Achitei et al., 2013). This has been demonstrated conclusively in animal models of colitis (Siddiqui et al., 2006). In spite of the importance of oxidative stress during IBDs, to date, no reliable serum biomarkers have been found to monitor this aspect of the disease. The results of our study lead us to propose CA in conjunction with AOPPs as biomarkers to monitor this aspect of IBD. The inclusion of biochemical parameters to value ulcerative colitis was proposed by Seo et al. (1992), who put forward an activity index including five factors, namely, bloody stool, bowel movements, erythrocyte sedimentation rate (ESR), hemoglobin (Hb) and serum albumin. Our results suggest that oxidised albumin might usefully be added to this index. Our proposition is based on the information that several laboratories are developing suitable methods for the rapid and sensitive quantification of different forms of oxidized albumin using mass spectroscopy (Nagumo et al., 2014).

Currently, we do not know the sources of the free radical involved in albumin oxidation, but results suggest that both a local or primary origin (e.g. immune cells infiltrated in the inflamed mucosa as neutrophils) together with a systemic or secondary origin (like the liver) might be involved; as experimental colitis results in the generation of oxidised proteins in colonic mucosa, while IFX treatment reduces their levels (mainly in the nucleus). In this regard, albumin has been reported to translocate to epithelial cell nuclei as a reaction to oxidative stress, thereby regulating the antioxidant response element (ARE) in order to control the antioxidant enzyme expression involved in adaptive cellular responses (Weber et al., 2004). Unfortunately, we do not know at present whether during experimental colitis the albumin translocates to the nucleus and is more carbonylated with respect to control, nor whether IFX reverses both effects. On the other hand, using an *in vitro* model to study the effect of inflammation on oxidised albumin, we did observe that treating hepatocytes with the combination of proinflammatory cytokines (TNF- α + interleukin-6) increased the carbonylation of synthesised albumin, whereas IFX partially reversed this process. Therefore, the inhibitory effects of infliximab on the oxidation of albumin may occur in the colon and in the liver of the rats, and no hypothesis can be ruled out.

However that might be, our results suggest that CA might be a useful biomarker for monitoring the oxidative stress observed in IBD.

Acknowledgements

We would like to thank the Animal Experimentation Centre of the University of Alcalá for its technical help. The authors

also thank Foreign Languages Service of Translation (Universidad de Alcalá) and Dr Marta Galán Herranz for linguistic assistance.

Declaration of interest

This study was supported by Universidad de Alcalá/Comunidad de Madrid (Grants CCG10-UAH/BIO-5971 and UAH2011/BIO-007) and Comunidad de Madrid (Grant S2010/BMD-2423).

References

- Achitei D, Ciobica A, Balan G, et al. (2013). Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients. *Dig Dis Sci* 58: 1244–9.
- Bargagli E, Penza F, Vagaggini C, et al. (2007). Analysis of 618 carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with diffuse lung diseases. *Lung* 185:139–44.
- Christophi GP, Rong R, Holtzaple PG, et al. (2012). Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 18:2342–56.
- Colombo G, Clerici M, Giustarini D, et al. (2012). Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases. *Antioxid Redox Signal* 17: 1515–27.
- Cuevas EP, Escribano O, Chiloeches A, et al. (2007). Role of insulin receptor substrate-4 in IGF-I-stimulated HEPG2 proliferation. *J Hepatol* 46:1089–98.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23–38.
- D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. (2007). A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 132: 763–86.
- Gallardo M, Barrio S, Fernández M, et al. (2013). Proteomic analysis reveals heat shock protein 70 has a key role in polycythemia Vera. *Mol Cancer* 12:142–54.
- Guijarro LG, Mate J, Gisbert JP, et al. (2008). N-acetyl-L-cysteine combined with mesalamine in the treatment of ulcerative colitis: randomized, placebo-controlled pilot study. *World J Gastroenterol* 14: 2851–7.
- Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I, et al. (2008). Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 14:794–802.
- Levin GY, Egorihina MN. (2013). The role of oxidized albumin in blood cell aggregation disturbance in burn disease. *Int J Burns Trauma* 3: 115–21.
- Lim PS, Jeng Y, Wu MY, et al. (2013). Serum oxidized albumin and cardiovascular mortality in normoalbuminemic hemodialysis patients: a cohort study. *PLoS One* 8:e70822.
- Lundsgaard C, Hamberg O, Thomsen OO, et al. (1996). Increased hepatic urea synthesis in patients with active inflammatory bowel disease. *J Hepatol* 24:587–93.
- Masoodi I, Tijjani BM, Wani H, et al. (2011). Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review. *Ger Med Sci* 9: 1–7.
- Mera K, Anraku M, Kitamura K, et al. (2005). The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1322–8.
- Michelis R, Kristal B, Zeitun T, et al. (2013). Albumin oxidation leads to neutrophil activation *in vitro* and inaccurate measurement of serum albumin in patients with diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med* 60:49–55.
- Moran A, Jones A, Asquith P. (1995). Laboratory markers of colonoscopic activity in ulcerative colitis and Crohn's colitis. *Scand J Gastroenterol* 30:356–60.
- Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, et al. (2014). Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One* 9:e85216.

- Oetl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, et al. (2013). Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol* 59:978–83.
- Seo M, Okada M, Yao T, et al. (1992). An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 87: 971–6.
- Shi XZ, Winston JH, Sarna SK. (2011). Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:G41–51.
- Siddiqui A, Ancha H, Tedesco D, et al. (2006). Antioxidant therapy with N-acetylcysteine plus mesalamine accelerates mucosal healing in a rodent model of colitis. *Dig Dis Sci* 51:698–705.
- Staros EB. (2003). Molecular discoveries alter our view of inflammatory bowel disease. A review from scientific, clinical, and laboratory perspectives. *Am J Clin Pathol* 119:524–39.
- Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. (2004). Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 95:721–7.
- Ternant D, Mulleman D, Degenne D, et al. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit* 28:169–74.
- Walsh AJ, Ghosh A, Brain AO, et al. (2014). Comparing disease activity indices in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 8:318–25.
- Weber TJ, Negash S, Smallwood HS, et al. (2004). Calmodulin involvement in stress-activated nuclear localization of albumin in JB6 epithelial cells. *Biochemistry* 43:7443–50.
- Xie F, Sun S, Xu A, et al. (2014). Advanced oxidation protein products induce intestine epithelial cell death through a redox-dependent, c-jun N-terminal kinase and poly (ADP-ribose) polymerase-1-mediated pathway. *Cell Death Dis* 5:e1006.

CAPÍTULO III. ESTUDIO DEL PAPEL DEL AIF-1 EN LA DIFERENCIACIÓN DEL LINFOCITO T. IDENTIFICACIÓN DEL AIF-1 COMO POSIBLE BIOMARCADOR DE LA ENFERMEDAD DE CROHN

Como se ha descrito previamente, en la EII se produce una desregulación del sistema inmunológico que lleva asociada una infiltración de células inmunes en la zona intestinal afectada [Brazil *et al* 2013]. Aunque es una enfermedad idiopática, el sistema inmune juega un papel vital en el inicio y cronificación de la enfermedad. Desde el punto de vista inmunológico, clásicamente la EC se manifiesta con un perfil de citocinas del tipo Th 1 [Parronchi *et al* 1997], IL-2 e IFN- γ [Swain *et al* 2012].

Recientemente, un estudio de GWAS ha asociado un SNP (polimorfismo de un único nucleótido) en la región reguladora del gen AIF-1, 6p21.3, con el riesgo de padecer EC [Julià *et al* 2013].

El AIF-1 fue inicialmente caracterizado en macrófagos infiltrados en el corazón transplantado de una rata en un modelo de rechazo crónico [Utans *et al* 1995]. Su expresión ha sido documentada en macrófagos, bazo, leucocitos de sangre periférica, timo [Autieri 1996] [Hara *et al* 1999], linfocitos T [Kelemen & Autieri 2005], etc. Se ha determinado la expresión de ARN mensajero de AIF-1 en el intestino humano [Autieri 1996], y se encuentra aumentado en la mucosa intestinal de cerdos con malnutrición [Mentschel *et al* 2002]. Sin embargo, no se conoce su función en el intestino, pero se ha descrito el AIF-1 en lesiones intestinales de ratones con colitis experimental [Morohashi *et al* 2003]. Además, dicha proteína está presente en el desarrollo de múltiples enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la diabetes tipo I, en vasculopatías, enfermedades autoinmunes, daño cerebral y cáncer entre otras [Zhao *et al* 2013]. En cuanto su función, se encontró que tras la sobreexpresión de AIF-1 en macrófagos aumentó significativamente la expresión de IL-6 y la subunidad p40 de la IL-12 tras la estimulación con lipopolisacárido [Watano *et al* 2001]. Estas citocinas juegan un papel central en la respuesta inflamatoria Th 1. Sin embargo, el papel del AIF-1 en la EII es desconocido.

Basándonos en estos antecedentes, decidimos estudiar el efecto del AIF-1 en la diferenciación de células T *in vitro* y los posibles cambios en el suero de pacientes con EC.

En una serie de 4 pacientes con EC se estudió la presencia de AIF-1 en biopsias de colon mediante técnicas de inmunohistoquímica. A continuación, determinamos los niveles de AIF-1 sérico en 23 pacientes con EC clasificados en función de la actividad de la enfermedad mediante el índice de Harvey-Bradshaw en activos (>4) e inactivos (≤ 4).

Para estudiar la localización de AIF-1 en PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) humanas, se aislaron las distintas poblaciones de mononucleares presentes en la sangre de sujetos sanos utilizando citometría de flujo y los marcadores específicos CD3, CD4 CD19, CD56, CD45RA y CCR7. Las subpoblaciones aisladas obtenidas: linfocitos T, linfocitos B, monocitos, NK (*Natural Killers*), células CD4+ *naïve*, células CD4+ memoria, células CD4+ efectoras y células CD8+, se utilizaron para determinar los niveles de expresión de ARN mensajero de AIF-1 mediante RT-qPCR (cuantitativa reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa).

En otra serie de experimentos, las células T *naïve* procedentes de PBMC fueron estimuladas durante 24 horas con Dynal CD3/CD28 (*T cell expander Dynabeads*) lo que da lugar a la expansión de manera específica de la célula T al estimular a la vez CD3 y CD28. En dichas condiciones se determinaron los niveles de expresión de AIF-1, IL-2 e IFN- γ , mediante RT-qPCR. Este estudio se completó con la determinación de los niveles de proteína de AIF-1, IL-2 e IFN- γ por citometría de flujo. Además, se determinaron los niveles proteicos de AIF-1 por *western blot* en el lisado y en el medio de cultivo de las PBMCs estimuladas con Dynal CD3/CD28.

Para estudiar el efecto del AIF-1 durante la expansión y diferenciación de los linfocitos T, se desarrollo un modelo *in vitro* de diferenciación del tipo Th 1. La diferenciación hacia un fenotipo Th 1 se llevó a cabo coincubando las PBMCs con Dynal CD3/CD28 en presencia de IL-12 y anti-IL-4 para inhibir la respuesta Th 2. Dichos experimentos se llevaron a cabo en presencia de 6 nM de AIF-1 y en su ausencia, después de lo cual se estudió los niveles de ARN mensajero de AIF-1, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 y TGF- β , y los niveles proteicos de STAT-1, pSTAT-1, FOXP3 y CD25 mediante inmunoblot. La concentración de AIF-1 utilizada se basó en estudios previos de Kadoya y colaboradores [Kadoya et al 2014], y en los valores séricos obtenidos en humanos [Fukui et al 2012] y ratón [Zhao et al 2012].

Por último, se ensayo el efecto del AIF-1 sobre la proliferación y la apoptosis durante la expansión y diferenciación hacia el fenotipo Th 1 de los linfocitos T. Para estudiar el ciclo celular se valoró Rb (retinoblastoma), pRb (fosforilación de retinoblastoma), Ciclina E, CDK2 (quinasa dependiente de ciclina 2), Ciclina D1 y CDK4 (quinasa dependiente de ciclina 4) por *western blot*, este estudio se completó mediante citometría de flujo con ioduro de propidio. A continuación, la apoptosis se valoró por inmunoblot de caspasa 3 y citometría de flujo de Anexina V en las distintas subpoblaciones.

En el colon humano de sujetos sanos el AIF-1 se identificó mediante técnicas de inmunohistoquímica debajo de las células epiteliales formando una barrera celular. Sin embargo, en enfermos de Crohn aumentó drásticamente en las biopsias obtenidas de la zona ulcerada. Con el objetivo de estudiar la localización celular del AIF-1 aislamos los diferentes tipos de células del sistema inmune a partir de PBMCs de sujetos sanos y estudiamos el ARN mensajero del AIF-1 en las subpoblaciones obtenidas, observando el siguiente orden de expresión: linfocitos T > monocitos > linfocitos B > NK. Después de la expansión de los linfocitos T con Dynal CD3/CD28, se observó un aumento de la expresión del AIF-1 tanto a nivel del ARN mensajero como de la proteína. Se estudió en paralelo la expresión de IL-2 e IFN- γ para corroborar el proceso de expansión de los linfocitos T. Dicho incremento fue bloqueado en presencia de Brefeldina A la cual inhibe la secreción de otras citocinas al nivel del retículo endoplásmico [Misumi *et al* 1986]. Estos resultados sugieren que el AIF-1 se comporta como una proteína de secreción.

Al tratar con AIF-1 las PBMCs en las condiciones anteriores de expansión del linfocito T y su diferenciación hacia el fenotipo Th 1 mediante IL-12 y anti-IL-4 se observó que el AIF-1 potenciaba dicho proceso de diferenciación aumentando la producción de IL-2 e IFN- γ . En relación a esto, Chinnasamy y colaboradores han demostrado que AIF-1 promueve la activación y expansión de los linfocitos T CD4+ durante la encefalomiélis experimental [Chinnasamy *et al* 2015]. Estas células inmunes son claves en la respuesta adaptativa, y se ha sugerido que AIF-1 está implicada en la respuesta Th 1, ya que la sobreexpresión de AIF-1 en una línea celular de macrófagos hace que expresen grandes cantidades de IL-6, IL-10 e IL-12, citocinas que orquestan la respuesta Th 1 [Watano *et al*

2001]. El efecto del AIF-1 se acompañaba de un aumento de los linfocitos T efectores sin cambios significativos en su capacidad proliferativa.

Los resultados anteriores sugieren que el AIF-1 podría ser una proteína de secreción con efectos biológicos sobre los linfocitos T, por lo que estudiamos sus niveles séricos en una patología caracterizada por la inducción del fenotipo Th 1 como es la EC [Parronchi *et al* 1997].

Encontramos un aumento significativo de la proteína en el suero de pacientes con la enfermedad activa comparado con inactivos, además, de una correlación positiva entre los niveles de AIF-1 y el índice de la enfermedad. En consonancia con nuestros resultados se había determinado un aumento de AIF-1 en el suero de pacientes con nefropatía diabética [Fukui *et al* 2012]. Al estratificar los pacientes según su tratamiento, los pacientes con tratamiento anti-TNF- α , presentaron niveles más bajos de AIF-1. En relación a esto, los anti-TNF- α bloquean el TNF- α e inducen la apoptosis de células con TNF- α de membrana como células T y macrófagos [Atreya *et al* 2011]. Previamente, se había descrito el AIF-1 como un marcador de macrófagos, además, en este trabajo hemos demostramos que en PBMCs los linfocitos T presentan los más altos niveles de expresión de AIF-1. Por lo tanto, la bajada de los niveles de AIF-1 sérico en pacientes con EC puede deberse a la inducción de la apoptosis de macrófagos y linfocitos T ya que ambos tipos celulares son la principal fuente de AIF-1.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el AIF-1 potencia la diferenciación Th1 y aumenta la supervivencia de las células T efectoras liberándose al medio extracelular. Además, se ha observado que los pacientes con la enfermedad activa presentan mayores niveles de AIF-1 sérico. Estos resultados junto con otros previos en la literatura como son el aumento a nivel sérico de dicha proteína en el rechazo a transplante de corazón [Autieri *et al* 2002], riñón [McDaniel *et al* 2013] y en la nefropatía diabética [Fukui *et al* 2012], sugieren su papel en el desarrollo de la EC y por lo tanto de ahí deriva su interés como posible biomarcador sérico.



Allograft inflammatory factor-1 stimulates Th-1 differentiation: possible involvement in Crohn's Disease

Journal:	<i>Biomarkers</i>
Manuscript ID	TBMK-2016-0427
Manuscript Type:	Original paper
Date Submitted by the Author:	06-Dec-2016
Complete List of Authors:	Cano-Martínez, David; Universidad de Alcalá, Biología de Sistemas Monserrat, Jorge; Universidad de Alcalá, Medicine Marsal, Sara; Vall d'Hebron Hospital Research Institute, Rheumatology Research Group Lobo, M Val; Universidad de Alcalá, Biomedicine and Biotechnology Hernández-Breijo, Borja; Universidad de Alcalá, Biología de Sistemas M. Linares, Pablo; Hospital Universitario de la Princesa, Gastroenterology Service; Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP); Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD) Álvarez-Mon, Melchor; Universidad de Alcalá de Henares, Department of Medicine and Medical Specialties Gisbert, Javier; Hospital Universitario de la Princesa, Gastroenterology Service; Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP); Centro de investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD) Guijarro, Luis; Universidad de Alcalá, Biología de Sistemas
Keywords:	Inflammatory bowel disease, T-cell, Interferon- γ , anti-TNF

**Allograft inflammatory factor-1 stimulates Th-1 differentiation: possible
involvement in Crohn's Disease**

David Cano-Martínez*, Jorge Monserrat†, Sara Marsal‡, MV Lobo§, Borja Hernández-Breijo*, Pablo M. Linares¶, Melchor Álvarez-Mon †, Javier P. Gisbert¶, Luis G. Guijarro*.

*Department of Systems Biology, University of Alcalá, Alcalá de Henares. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Spain.

†Department of Medicine and Medical Specialties, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain.

‡Vall d'Hebron Hospital Research Institute, Rheumatology Research Group. Barcelona, Spain.

§Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain

¶Gastroenterology Service, Hospital Universitario de La Princesa and Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Spain.

Shorttitle: AIF-1 and T-cells in Crohn's disease.

Corresponding Author: Prof. Luis G Guijarro, Departamento de Biología de Sistemas, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD). Universidad de Alcalá, 28871, Alcalá de Henares, Spain.

Email: luis.gonzalez@uah.es. Phone: 34 1 8854865; Fax: 34 1 8854585

ABSTRACT:

Purpose: We study the role of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in the differentiation of human T-cells and the serum levels of AIF-1 in Crohn's disease (CD) patients.

Materials and Methods: Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by flow cytometry. The mRNA levels corresponding to the different cytokines were quantified by qPCR. Serum levels of AIF-1 were analyzed by immunoblot.

Results: The AIF-1 transcript, was observed in all populations of PBMCs studied with the following order of expression: T-lymphocytes > Monocytes > B- lymphocytes > NK cells. The expansion of T-cells by co-stimulation of CD3 and CD28 increased dramatically the AIF-1 expression. Treatment of human PBMCs with recombinant human AIF-1 increased the expression of interferon- γ and interleukin-2 during Th1 cell differentiation. The levels of AIF-1 in serum were higher in active CD patients (Harvey-Bradshaw index > 4) than in inactive CD patients (Harvey-Bradshaw index \leq 4) ($p < 0.05$). Serum levels of AIF-1 decreased in the patients treated with anti-TNF- α antibodies with respect to naïve patients ($p < 0.05$).

Conclusions: The augmented concentration of AIF-1 in serum from active Crohn's disease patients and their potential effect on Th1 cell differentiation, suggests a proinflammatory role for this protein in Crohn's disease.

Key words: Inflammatory bowel disease (IBD), T-cell, Interferon- γ , anti-TNF.

INTRODUCTION:

Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is a Ca^{2+} -binding protein inducible by interferon (IFN)- γ (Utans et al. 1995). AIF-1 was originally identified in infiltrating macrophages in the cardiac allograft of a rat model of chronic rejection (Autieri et al. 2002). It has since been described in other cells such as the dendritic cells (Chen et al. 1997), Kupffer cells (Nagakawa et al. 2004), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), fibroblast (Del Galdo and Jimenez 2007), endothelial cells (Tian et al. 2009) and vascular smooth muscle cells (Sommerville et al. 2012). In human beings, mRNA coding to AIF-1 or the corresponding protein, have been observed in the liver, small intestine and colon (Autieri 1996). However, there are scarce data about the expression of AIF-1 in T-cells.

From a functional point of view, AIF-1 is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages (Yang et al. 2005) since it stimulates the secretions of interleukin-12 (IL-12), and interleukin-6 (IL-6) (Watano et al. 2001). In addition, AIF-1 induces chemotaxis of macrophages and PBMCs (Kadoya et al. 2014) by Rac1-dependent mechanisms (Tian and Autieri 2007) and by stimulating chemokine secretion (Kadoya et al. 2014).

AIF-1 seems to be involved in several inflammatory diseases as encephalomyelitis, uveitis, neuritis (Schluesener et al. 1999), rheumatoid arthritis (Kimura et al. 2007), sclerosing cholangitis (Zen et al. 2016) and inflammatory bowel diseases (IBD) (Román et al. 2016). Inactivation of the corresponding gene of AIF-1 leads to a phenotype that is more resistant to collagen-induced arthritis in mice (Casimiro et al. 2013) and also ameliorates experimental encephalomyelitis by restricting CD4^{+} T-cell expansion (Chinnasamy et al. 2015). The role of AIF-1 in

1
2
3 TNBS-induced colitis are controversial, because AIF-1 overexpression in mice
4
5 conferred partial protection against experimental colitis (Morohashi et al. 2003), that it
6
7 is explained by the shift from the Th1 to Th2 phenotype (Morohashi et al. 2003). This
8
9 latter result suggests a role for AIF-1 in T-cell differentiation and in the development of
10
11 IBD.
12

13
14 IBD includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). In CD,
15
16 inflammation affects all layers of the intestine, whereas the effects of UC are largely
17
18 limited to the mucosa (Nikolaus and Schreiber 2007). It has been proposed that the two
19
20 types of IBD could be distinguished by imbalances in Th1/Th2 responses of T-
21
22 lymphocytes (Fuss 2008). In CD, Th1 prevails over Th2 phenotype, which leads to an
23
24 excess of IFN- γ production (Strober et al. 2007).
25
26
27
28

29
30 Meanwhile, genome-wide association studies (GWAS) have associated several
31
32 single nucleotide polymorphisms in the AIF-1 locus (6p21.3) with the risk of suffering
33
34 from CD (Julià et al. 2013) and we have also observed an increase of AIF-1 in serum
35
36 and in inflamed colon of rats with experimental colitis (Román et al. 2016). These data
37
38 prompted us to study the effect of AIF-1 on T-cell differentiation *in vitro* and its
39
40 possible changes in the serum of CD patients.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study was performed at the La Princesa University Hospital (Madrid), in the Principe de Asturias University Hospital (Alcala de Henares, Madrid) and in the Faculty of Medicine of Alcala University (Madrid) over a period of 24 months. The study was conducted according to the guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Approval was obtained from the Institutional Ethics Committees of La Princesa University Hospital and of Principe de Asturias University Hospital. All patients had signed a research authorization consent form at the time of their clinical assessment. The studies with PBMC (peripheral blood mononuclear cells) were performed in healthy blood donors recruited at the Principe de Asturias University Hospital. Serum concentrations of AIF-1 were measured in CD patients recruited in the outpatient clinic at La Princesa University Hospital. Patients treated with thiopurines or with anti-TNF α agents (infliximab or adalimumab) or naïve were included. Disease activity was evaluated with the Harvey-Bradshaw index. We defined “active” as conditions with a Harvey-Bradshaw index > 4 . “Inactive” patients were defined as conditions with a Harvey-Bradshaw index ≤ 4 (Table 1).

Immunocytochemistry protocol

For immunocytochemistry of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), cytospin preparation of cells isolated from buffy coat were left to air dry and then were fixed with cold acetone (60 seconds) and with PBS (1% FBS and 0.1% saponin) for 30 minutes. Cells were then incubated with polyclonal rabbit antibodies against AIF-1 diluted 1:200 for 1 hour at room temperature, after washing, cells were incubated for 30 minutes more with chicken anti-rabbit-Alexa Fluor 488. Finally, cells were nuclear

counterstained with DAPI. Negative controls were performed by incubating the samples with non-immune rabbit serum instead of the first antibody.

Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood and separation into subpopulations

The blood samples were collected by antecubital puncture from healthy volunteers in the consulting room from Principe de Asturias University Hospital. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Boyum 1968). For flow cytometry studies, cells were re-suspended (1×10^6 cells/mL) in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 25 mM Hepes and 1% penicillin–streptomycin. Blood samples were prepared within 1 h after sample collection.

After separation of mononuclear cells by density, 100 μ L of PBMCs (1×10^6 cells) were placed into 5 mL FACS tubes with the following combinations of monoclonal antibodies: CD3-APC (Becton Dickinson), CD19-FITC (Becton Dickinson), and CD56-PE (Becton Dickinson). Cells were incubated on ice for 30 minutes in the dark. Washed cells with 1 mL of PBS were re-suspended in 100-500 μ L of PBS. To obtain the staining controls, cells were incubated with irrelevant anti-mouse isotype controls IgG1 or IgG2a. Target cells were isolated by Fluorescence-activated cell sorting (FACS Aria cell sorter). The data were analyzed using FACSDiva software, version 5.0. Cellular debris and dead cells were excluded during sample analysis in order to obtain an accurate assessment of purity. T-Lymphocytes, B-Lymphocytes, monocytes, natural killers were obtained with a high purity (>95%).

In other set of experiments, different types of T-cells were isolated from PBMCs using the following combination of monoclonal antibodies: CD3-FITC (Becton

Dickinson), CD4-PerCP (Becton Dickinson), CD45RA-APC (Becton Dickinson) and CCR7-PE-Cy7 (Becton Dickinson). The target cells were isolated following the above-mentioned method. CD4⁺, CD8⁺, naïve CD4⁺, effector CD4⁺ and memory CD4⁺ were obtained with a high purity (>95%).

Human T-cell expansion and subsequent Th1 cell differentiation

PBMCs were cultured with Dynal CD3/CD28 T Cell Expander (Dynabeads®) at a 1 bead per cell ratio during 24h in medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Protocol of T-cell expansion). Anti-IL-4 neutralizing antibody (10 µg/ml) and recombinant mouse IL-12 (5 ng/ml) were added to preceding medium to obtain Th1 differentiated cells (Protocol of Th1 differentiation) and incubated during the same time. The control cells were obtained in presence of 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

Flow cytometric analysis of cytokine staining, of cell cycle and of apoptosis

PBMCs were incubated with anti CD8-Pacific Blue monoclonal antibody (Invitrogen) to analyze CD8⁺ cells (CD3⁺, CD8⁺) and CD4⁺ cells (CD3⁺, CD8⁻). For intracytoplasmic staining of cytokines, cells were fixed and permeabilized in presence of brefeldin A, and then the cytokines were stained with a combination of monoclonal antibodies: anti-interleukin-2-PE-YG (Becton Dickinson), anti-interferon-γ-Alexa Fluor 700 (Becton Dickinson) and anti-AIF-1-FITC (Abcam).

Cell cycle assay was carried out after permeabilization of PBMCs with NP40 (0.5 mg/mL) and subsequent treatment with RNase (0.5 mg/mL) during 30 min. After this time, 25 µL of propidium iodide were added into the medium and then the flow cytometry was performed.

In other set of experiments, T-cell present in PBMCs were stained using the combination of two antibodies: anti-CD45RA-APC (Becton Dickinson) and anti-CD27-Allophycocyanin-alexa-700 (eBioscience). The staining protocol permitted to distinguish between naïve T-cells (CD45RA+, CD27+), central memory cells (CD45RA-, CD27+), effector memory cells-no terminated (CD45RA-, CD27-) and effector memory cells-terminated (CD45RA+, CD27-) (Monserrat et al. 2014). Apoptotic cells were detected using FITC conjugated Annexin V and propidium iodide (PI). Cells were washed twice with cold PBS and re-suspended in a buffer containing 10 mmol/L HEPES, 140 mmol/L NaCl, and 250 mmol/L CaCl₂ at a concentration of 1 x 10⁶ cells/mL, then 5 µL of Annexin V-FITC and 10 µL of PI were added to the suspension into a 5 mL culture tube and incubated for 15 min in the dark at room temperature then cells were analyzed by flow cytometry.

Real Time quantitative PCR protocol

Total RNA was extracted from isolated subpopulations or from PBMCs using RNeasy Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. The isolated RNA was quantified by optical density measurement using the Nanodrop.

Total RNA (500 ng) underwent reverse transcription (RT) to complementary deoxyribonucleic acid (cDNA). RT was performed at 37°C for 15 minutes and at 85°C for 5 seconds using PrimeScript® RT reagent Kit (Takara) following the manufacturer's protocol.

Quantitative PCR was carried out using Kapa Sybr fast qPCR kit (Kapa Biosystems) and the following primers:

IL-2 (forward) 5' CACTAATTCTTGCACTTGTCAC 3'

IL-2 (reverse) 5' CCTTCTTGGGCATGTAAACT 3'

IFN-gamma (forward) 5' CTAATTATTCGGTAACTGACTTGA 3'

IFN-gamma (reverse) 5' ACAGTTCAGCCATCACTTGGA 3'

IL 4 (forward) 5' ACAGCCTCACAGAGCAGAAGACT 3'

IL 4 (reverse) 5' TGTTCTTGGAGGCAGCAAAGA 3'

IL 17 (forward) 5' AGAGATATCCCTCTGTGATC 3'

IL 17 (reverse) 5' TACCCCAAAGTTATCTCAGG 3'

IL 10 (forward) 5' CATCGATTTCTTCCCTGTGAA 3'

IL 10 (reverse) 5' TCTTGGAGCTTATTAAGGCATTC 3'

18-S (forward) 5' GGACACGGACAGGATTGACA 3'

18-S (reverse) 5' ACCCACGGAATCGAGAAAGA 3'

AIF-1 isoform 1 (forward) 5' ATGGAGTTTGACCTTAATGGAAATGGC 3'

AIF-1 isoform 1 (reverse) 5' TCAGGGCAACTCAGAGATACGTTT 3'

AIF-1 isoform 2 (forward) 5' ATGGAGTTTGACCTTAATGGAAATGGC 3'

AIF-1 isoform 2 (reverse) 5' TCACATTTTATAGGATGGCAGACCTCTTG 3'

AIF-1 isoform 3 (forward) 5' ATGAGCCAAACCAGGGATTACAG 3'

AIF-1 isoform 3 (reverse) 5' TCAGGGCAACTCAGAGATAGCTTT 3'

Reactions were run on 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, Life technologies). All amplifications were run in triplicate. Transcription controls (no-template and no-reverse) were run to determine any contamination or the generation of primer dimers. Gene expressions were calculated using the comparative Ct (Cycle threshold) method after normalization using 18S rRNA.

Western blot

All protein samples were separated by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) and then transferred to a nitrocellulose membrane.

These membranes were incubated with polyclonal rabbit antibodies against AIF-1, pRB, Rb, Cyclin E, CDK2, FOXP3, CD25, or with monoclonal mouse antibodies against Cyclin D1, STAT-1, pSTAT-1, procaspase-3, or polyclonal goat antibodies against Albumin or CDK4. Detection was performed using the specific secondary antibody coupled to horseradish peroxidase followed by incubation with chemiluminescent reagent (ECL, Amersham) and subsequent exposition with an X-ray film (Hyperfilm ECL, Amersham).

Statistical Analysis

For comparison of mRNA expression levels of different cytokines and of AIF-1, we used non-parametric tests (Mann-Whitney U test). The count studies of mononuclear cells were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni correction. For comparison of serum concentrations of AIF-1 and Harvey-Bradshaw Index between CD patients we used the Mann-Whitney U test. The Spearman's correlation coefficient was used to examine the correlation between serum levels of AIF-1 and the Harvey-Bradshaw Index in CD patients. $p < 0.05$ was considered significantly different.

RESULTS

Localization of AIF-1 in peripheral blood mononuclear cells

Firstly, we identified the presence of AIF-1 in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by immunocytochemistry methods (Figure 1A). After isolation of different types of mononuclear cells by FACS with more than 95% purity we studied the expression of three isoforms of AIF-1 (1, 2, 3) using qPCR (Figures 1B and 1C), as previously described (Del Galdo et al. 2006). The isoform-3 was undetectable in all populations studied (data not shown) and the analysis of this isoform was not continued. The transcript level of AIF-1 corresponding to isoform 2 (black bar) was more abundant than isoform 1 (white bar), and was observed in all populations studied with the following order of expression: T-lymphocytes > Monocytes > B-lymphocytes > NK cells (Figure 1C). The role of AIF-1 has previously been extensively characterized in macrophages/monocytes, and we therefore focused our interest on T-lymphocytes.

After isolating CD4⁺ and CD8⁺ by FACS (Figure 1D) we observed a preponderance of the isoform-2 (black bar) and the isoform-1 (white bar) of AIF-1 in CD4⁺ cells with respect to CD8⁺ cells (Figure 1F). After separation by FACS of different CD4⁺ cell subtypes (Figure 1E) we observed that the transcripts for AIF-1 were more expressed in naïve cells than in memory or in effector cells (Figure 1F). Considering the role of CD4⁺ cells in the adaptive immunity, our results suggest that AIF-1 may be important in the T-cell response to antigen presentation. Subsequent experiments were designed to characterize the expression of AIF-1 during T-cell expansion.

Induction of AIF-1 expression during T-cell expansion *in vitro*

When naïve T-cells were expanded by co-stimulation of CD3 and CD28 (Dynabeads®), the transcripts corresponding to AIF-1 increased dramatically, although to a lesser extent than interleukin-2 and interferon-gamma, two cytokines involved in clonal expansion and in Th1 cell differentiation, respectively (Figure 2A). The transcriptomic study of AIF-1 was corroborated by the study of the protein expression by western blot (Figure 2B). Interestingly, when mononuclear cells were treated with brefeldin A (a fungal metabolite that inhibits protein secretion), the Dynabeads® stimulation increased AIF-1 expression but remains inside the cells. In the absence of brefeldin A, AIF-1 was secreted to the culture medium (Figure 2B) in the same conditions of incubation. These observations were corroborated using flow cytometry techniques. During T-cells expansion in the presence of brefeldin A, the levels of AIF-1 increased in both CD4+ and CD8+ cells a 206% and a 388% with respect to basal values, respectively (Figure 2C). We simultaneously studied the induction of interleukin-2 and interferon-gamma in the same cell populations, as control of T-cell stimulation (Figure 2C). Together, all these data suggest that AIF-1 could be released to the extracellular medium by T-cells like it has been described for classical cytokines. Based on this idea, we studied the effects of incubation of recombinant human AIF-1 (rhAIF-1) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Study of the effects of rhAIF-1 on peripheral blood mononuclear cell biology: Analysis of T-cell differentiation, cell cycle and apoptosis of T-lymphocytes.

When PBMCs were incubated with Dynabeads® (CD3/CD28 stimulation) it has been observed the T-cell expansion (Berger et al. 2003). This experiment was performed in the presence of interleukin-12 and anti-interleukin-4, to promote Th1 polarization and to inhibit simultaneously Th2 response. We used this model to study the effect of rhAIF-1 (recombinant human AIF-1) on the potentiation of Th1 cell

differentiation. Previous results showed that incubation of PBMCs with 6 nM of AIF-1 had a significant effect on chemotaxis (Kadoya et al. 2014) and it is between the concentrations described both in human serum (Fukui et al. 2012) and in mouse serum (Zhao et al. 2012). Therefore, we have used 6 nM of rhAIF-1 in subsequent experiments.

During T-cell expansion of PBMCs using Dynabeads® during 24 hours we observed an increase in the mRNA corresponding to IL-2, IFN- γ , IL-4, TGF- β and IL-10 (Figure 3A, 3B, 3C, 3D and 3E). During the induction of Th1 differentiation in PBMCs for 24 hours by incubation with IL-12 and anti-IL-4 plus Dynabeads®, the levels of expression of IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-10 not change compared to the stimulation with Dynabeads® alone (Figure 3A, 3B, 3C and 3E). However, the induction of Th1 differentiation decrease the expression of TGF- β (Figure 3D). Interestingly, the co-incubation with 6 nM of AIF-1 for 24 hours in the conditions of Th1 differentiation, increases significantly the expression of interleukin-2 (Figure 3A) and IFN- γ (Figure 3B) with no significant changes in the mRNA levels of IL-4 (Figure 3C), TGF- β (Figure 3D) and IL-10 (Figure 3E). The dramatic increase in the transcription of IL-2 observed during T-cell expansion was completely blocked in the presence of cyclosporine A (CSA) (Figure 3A). When PBMCs were submitted during 24 hours to Th1 differentiation, we observed an increase of the levels of Foxp3 and CD25 (two classical biomarkers of T reg response) (Figure 3F), consistent with the previous effects observed on IL-10 expression using the same model. However, the addition of AIF-1 (6 nM) to the incubation medium of the PBMCs in this last conditions, did not produce significant changes on these two proteins studied by western blot (Figure 3F). Altogether, our results showed that incubation of PBMCs with AIF-1

(6 nM) for 24 hours, enhanced the production of IL-2 and IFN- γ during Th1 differentiation.

Interestingly, we observed the increase of cell count of PBMCs incubated with AIF-1 (6 nM) for 4 days *in vitro*. The effect of AIF-1 was observed both on basal conditions (10% FBS) or when cells were submitted to T-cell expansion and concomitant Th1 cell differentiation (Figure 4A). We studied also cell cycle regulatory proteins under these conditions, in an intermediate period (24h) of incubation with the stimulators. In Figure 4B, we show that pRb, Rb, cyclin D1 and CDK4 are up-regulated, while there are not significant changes in cyclin E and CDK2 during T-cell expansion and concomitant Th1 cell polarization. The increase of cyclin D1 is consistent with the acceleration of the cell cycle, because it leads to the stimulation of CDK4. This kinase is essential to overcoming check point 1 of the cell cycle and in consequence allowing cell division (Figure 4B). However, we did not observe significant changes, either in the levels of these proteins or in their phosphorylation status with the co-incubation with 6 nM of rhAIF-1 for 24 hours, in any of the cell cycle proteins studied (Figure 4B).

These last results were corroborated using flow cytometry techniques of cells stained with propidium iodine (Figure 4C). Under baseline conditions (in the presence of 10%FBS for 24 hours) the proportion of cells in *G0/G1* was 90.9% and in *S + G2/M* it was 8.4%. After the induction of T-cell expansion and Th1 differentiation during 24 hours, the proportion of quiescent cells decreased to 80.1% (*G0/G1*) and the number of cells entering the cell cycle (*S + G2/M*) increased to 18.1%. The addition of rhAIF-1 to the incubation medium, under baseline (10% FBS) or in stimulating conditions (Th1 differentiation), did not significantly change the aforementioned proportions (Figure 4C).

1
2
3 In another set of experiments, we studied apoptosis to obtain an explanation of
4 the increase of cell number during co-incubation of PBMCs with rhAIF-1. Using the
5 procaspase-3 degradation test, we observed a modest increase in apoptosis of PBMCs
6 during 24 hours of T-cell expansion (incubation with Dynabeads®), which markedly
7 increased during Th1 cell differentiation. Under these latter conditions, the addition of
8 exogenous rhAIF-1 (6 nM) in the medium was able to partially protect the cells from
9 apoptosis (Figure 5A and 5B). However, the procaspase-3 degradation test does not
10 distinguish between cellular lineages, and as such, we studied the apoptosis by flow
11 cytometry techniques.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 PBMCs subjected to Th1 cell differentiation for 24 hours were stained with
24 Annexin V and with specific antibodies to distinguish between different types of T-
25 lymphocytes by flow cytometry (Figure 5C). During Th1 cell differentiation, we
26 observed a dramatic increase in apoptosis in effector T-cells both in Not Terminated
27 (29.5% of apoptotic cells) and in Terminated (26.4% of apoptotic cells) phenotypes,
28 compared to baseline conditions (10% FBS), in which we observed a proportion of
29 apoptotic cells of 6.7% and 2.8% in Not Terminated (NT) and in Terminated (T)
30 effector T-cells phenotypes, respectively. However, when Th1 cell differentiation was
31 induced in presence of rhAIF-1 (6 nM), apoptosis decreased in Not Terminated (21.9%)
32 and in Terminated (20.4%) effector T-cells compared to the same conditions but in the
33 absence of rhAIF-1. This means that the apoptotic process was present in 9.5% of
34 effector T-cells in basal conditions (10% FBS), increased to 55.9% during Th1 cell
35 differentiation, decreasing to 42.3% in presence of rhAIF-1 (6nM). These data represent
36 three independent experiments. All the aforementioned results suggest that AIF-1 plays
37 a role in the potentiation of Th1 cell differentiation and increases the survival of T-
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

effector cells, which could be an essential process in the perpetuation of inflammation during CD.

Previous results suggest that AIF-1 could be released to extracellular fluids during T-cell activation, for this reason we estimated AIF-1 levels in serum from 23 patients with CD (Table 1).

As shown in Figure 6A, AIF-1 could be analyzed by western blot in serum. To normalize the results of AIF-1 serum for each sample a western blot of albumin was performed in parallel and the AIF-1/albumin ratio was estimated. When we compared the serum levels of AIF-1 from active CD patients (Harvey-Bradshaw index > 4) and inactive CD patients (Harvey-Bradshaw index ≤ 4), we observed a lower value for AIF-1 in inactive CD patients ($p < 0.05$) (Figure 6B). In addition, we observed a positive correlation between the level of AIF-1 serum and the Harvey-Bradshaw index (HBI) for each patient ($r_{\text{Spearman}} = 0.4830$; $p < 0.01$) (Figure 6C). When we stratify the CD patients by the pharmacological treatment that they received at the time of measurement of AIF-1, we observed that AIF-1 significantly decreased in CD patients treated with anti-TNFs medicines with respect to naïve CD patients (Figure 6D). These biochemical results are well correlated with the effect of treatment on the healing of the disease measured by the HBI. By contrast, we do not observe significant changes in AIF-1 in serum and in HBI, in the patients treated with thiopurines with respect to the naïve patients (Figure 6D).

DISCUSSION

Some results suggest that AIF-1 (allograft inflammatory factor) has an important role in experimental colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) (Roman et al. 2016) and by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Morohashi et al. 2003). In this latter paper, the authors suggested that AIF-1 plays a protective role in TNBS-induced colitis in mice because it promotes a phenotypic change from Th1 to Th2 in T-cells, although this hypothesis remains to be demonstrated in humans. Our study strongly suggests that AIF-1 potentiates the Th1 response in human beings and might have a proinflammatory role in CD patients.

Present study revealed that AIF-1 was present in circulating T-lymphocytes and in monocytes, but was barely detectable in B-lymphocytes and NK cells. Using FACS to isolate different subpopulations we observed that AIF-1 was present in naïve CD4⁺ cells and to a lesser extent in CD8⁺ cells. Naïve T-cells expansion by stimulation of CD3 and CD28 (Dynabeads®) increased AIF-1 expression dramatically, although less than that of interleukin-2 and IFN- γ , two cytokines involved in clonal expansion (Hombach et al. 2007) and in Th1-cell differentiation respectively (Döffinger et al. 1999). According to our results, stimulation of PBMCs by phytohemagglutinin (PHA) or by conditioned medium leads to a strong overexpression of AIF-1 in mononuclear cells (Kelemen and Autieri 2005). Initially, AIF-1 was considered an intracellular polypeptide that regulates several cellular functions (e.g. motility and proliferation) in a rac1-dependent manner (Tian and Autieri 2007). Recent results, showed that the *in vivo* treatment of medicinal leech with the recombinant protein AIF-1 induced massive angiogenesis and was a potent chemoattractant for macrophages (Schorn et al. 2015). Our results in human beings demonstrated that the incubation of PBMCs with the recombinant protein AIF-1, *in vitro* increase the transcription of IL-2 and IFN- γ during

Th1 polarization. However, we did not observe any modification of transcription of IL-4 (a hallmark of Th2 cell differentiation) or of IL-10 (a hallmark of T reg cell differentiation). Regulatory T cells (T reg) are specialized in halting the effector response against exogenous antigens when they fade away. As a consequence, this phenotypic change of T-cells is essential to avoid autoimmune reactions (Attridge and Walker 2014). The most important biomarkers of regulatory T-cells are IL-10, CD25 and Foxp3 (Guo et al. 2012). Our results showed that the incubation of PBMC with recombinant protein AIF-1, do not changed the above-mentioned markers of T reg response.

The strength of differentiation towards a Th1 phenotype depends on the availability of several stimuli, including CD3/CD28, IL-12 and IFN- γ (Bradley et al. 1996), among others. Our results suggest that AIF-1 potentiated this proinflammatory phenotype by activating IFN- γ secretion. However, the increase in the intensity of Th1 polarization was not due to the acceleration of the cell cycle by AIF-1, as showed by flow cytometric studies. These results were confirmed by the analysis of several cell cycle regulatory proteins including pSTAT-1/STAT-1, pRB/Rb, cyclin E/cyclin D1 and CDK2/CDK4 during Th1 differentiation. The discrepancies between our results and a previous study that showed that overexpression of AIF-1 in Molt-4 cells (a lymphoblastoid T-cell line in culture) increased cell proliferation (Kelemen and Autieri 2005), prompted us to study apoptosis during AIF-1 treatment in human PBMCs.

During T-cells expansion by stimulation of CD3 and CD28 (Dynabeads®), a prominent number of T-effector cells die by apoptosis, affecting primarily the CD4⁺ lineage (Mazur et al. 2008). In concordance with these previous results, during Th1 cell polarization, we observed an increase of apoptosis in the effector T-cells of the two

subpopulations of this lineage: completely differentiated (or Terminated) and partially differentiated (or Not Terminated) (Monserrat et al. 2014). The presence of AIF-1 attenuates apoptosis in the two types of effector T-cells. At present, we do not know the physiological and clinical relevance of this observation, but we must bear in mind that the effector cells are primed to enter in inflamed tissues and respond to external challenges by producing more IFN- γ .

Our results suggest that extracellular AIF-1 plays a role in potentiation of Th1 cell differentiation and in the prolongation of their survival. In accordance with this hypothesis, we observed that AIF-1 serum levels of active CD patients were higher than those of inactive CD patients. We also observed a positive correlation between AIF-1 serum levels and the activity index of CD patients. Interestingly, the decrease of AIF-1 in serum was significant in the patients treated with anti-TNF- α antibodies compared to naïve patients, which accord with previous results obtained in rats with DSS-induced colitis and treated with infliximab (Roman et al. 2016). The anti-TNF drugs show their pharmacological properties by blocking circulating TNF- α and also by inducing cell death of membrane TNF- α -expressing cells, like effector T-cells (Atreya et al. 2011). Previous data and our own results suggest that activated macrophages (Yang et al. 2005) and activated T-cell (our study) are the main sources of circulating AIF-1, therefore the apoptosis of this type of cells induced by anti-TNF drugs could explain the results in AIF-1 levels observed in CD patients.

CONCLUSION

In conclusion, previous data obtained in human inflammatory diseases like diabetic nephropathy (Fukui et al. 2012), rheumatoid arthritis (Kimura et al 2007), sclerosing cholangitis (Zen et al. 2016) and obesity (Lorente-Cebrián et al. 2013), together with present results, suggest that AIF-1 could be a new player involved in the deregulation of the cytokine network observed in CD patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Centro de Experimentación Animal (CEA) and the Centro de Biología Molecular (CBM) of the University of Alcalá. We thank Alfredo Prieto for reviewing of the manuscript.

DECLARATION OF INTEREST STATEMENT

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

FUNDING

This work was supported by [Grant numbers S2010/BMD-2423 and IPT-010000-2010-036].

REFERENCES

- Atreya, R., Zimmer, M., Bartsch, B., Waldner, M.J., Atreya, I., Neumann, H., Hildner, K., Hoffman, A., Kiesslich, R., Rink, A.D., Rau, T.T., Rose-John, S., Kessler, H., Schmidt, J., Neurath, M.F., 2011. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14⁺ macrophages. *Gastroenterology*, 141(6), 2026-38.
- Attridge, K., Walker, L.S., 2014. Homeostasis and function of regulatory T cells (T regs) in vivo: lessons from TCR-transgenic T regs. *Immunol. Rev.*, 259 (1), 23-39.
- Autieri, M.V., 1996. cDNA cloning of human allograft inflammatory factor-1: tissue distribution, cytokine induction, and mRNA expression in injured rat carotid arteries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 228 (1), 29-37.
- Autieri, M.V., Kelemen, S., Thomas, B.A., Feller, E.D., Goldman, B.I., Eisen, H.J., 2002. Allograft inflammatory factor-1 expression correlates with cardiac rejection and development of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*, 106 (17), 2218-2223.
- Berger, C., Blau, C.A., Clackson, T., Riddell, S.R., Heimfeld, S., 2003. CD28 costimulation and immunoaffinity-based selection efficiently generate primary gene-modified T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*, 101 (2), 476-484.
- Boyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 97, 77-89.
- Bradley, L.M., Dalton, D.K., Croft, M., 1996. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J. Immunol.*, 157 (4), 1350-1358.

Casimiro, I., Chinnasamy, P., Sibinga, N.E., 2013. Genetic inactivation of the allograft inflammatory factor-1 locus. *Genesis*, 51 (10), 734-740.

Chen, Z.W., Ahren, B., Ostenson, C.G., Cintra, A., Bergman, T., Moller, C., Fuxe, K., Mutt, V., Jornvall, H., Efendic, S., 1997. Identification, isolation, and characterization of daintain (allograft inflammatory factor 1), a macrophage polypeptide with effects on insulin secretion and abundantly present in the pancreas of prediabetic BB rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (25), 13879–13884.

Chinnasamy, P., Lutz, S.E., Riascos-Bernal, D.F., Jeganathan, V., Casimiro, I., Brosnan, C.F., Sibinga, N.E., 2015. Loss of Allograft inflammatory factor-1 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by limiting encephalitogenic CD4⁺ T cell expansion. *Mol. Med.*, 21, 233-41.

Del Galdo, F., Maul, G.G., Jiménez, S.A., Artlett, C.M., 2006. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.*, 54 (8), 2616-2625.

Del Galdo, F., Jiménez, S.A., 2007. T cells expressing allograft inflammatory factor 1 display increased chemotaxis and induce a profibrotic phenotype in normal fibroblasts in vitro. *Arthritis Rheum.*, 56 (10), 3478-3488.

Döffinger, R., Jouanguy, E., Altare, F., Wood, P., Shirakawa, T., Novelli, F., Lammas, D., Kumararatne, D., Casanova, J.L., 1999. Inheritable defects in interleukin-12- and interferon-gamma-mediated immunity and the TH1/TH2 paradigm in man. *Allergy*, 54 (5), 409-412.

- Fukui, M., Tanaka, M., Asano, M., Yamazaki, M., Hasegawa, G., Imai, S., Fujinami, A., Ohta, M., Obayashi, H., Nakamura, N., 2012. Serum allograft inflammatory factor-1 is a novel marker for diabetic nephropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 97(1), 146-50.
- Fuss, I.J., 2008. Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD?. *Inflammatory Bowel Dis.*, 14 (Suppl. 2), S110-112.
- Guo, X., Jie, Y., Ren, D., Zeng, H., Zhang, Y., He, Y., Pan, Z., 2012. In vitro-expanded CD4 (+) CD 25(high) Foxp3 (+) regulatory T cells controls corneal allograft rejection. *Hum. Immunol.*, 73 (11), 1061-1067.
- Hombach, A.A., Kofler, D., Hombach, A., Rappl, G., Abken, H., 2007. Effective proliferation of human regulatory T cells requires a strong costimulatory CD28 signal that cannot be substituted by IL-2. *J. Immunol.*, 179 (11), 7924-7931.
- Julià, A., Domènech, E., Ricart, E., Tortosa, R., García-Sánchez, V., Gisbert, J.P., Nos Mateu, P., Gutiérrez, A., Gomollón, F., Mendoza, J.L., Garcia-Planella, E., Barreiro-de Acosta, M., Muñoz, F., Vera, M., Saro, C., Esteve, M., Andreu, M., Alonso, A., López-Lasanta, M., Codó, L., Gelpí, J.L., García-Montero, A.C., Bertranpetit, J., Absher, D., Panés, J., Marsal, S., 2013. A genome-wide association study on a southern European population identifies a new Crohn's disease susceptibility locus at RBX1-EP300. *Gut*, 62 (10), 1440-1445.
- Kadoya, M., Yamamoto, A., Hamaguchi, M., Obayashi, H., Mizushima, K., Ohta, M., Seno, T., Oda, R., Fujiwara, H., Kohno, M., Kawahito, Y., 2014. Allograft inflammatory factor-1 stimulates chemokine production and induces chemotaxis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 448 (3), 287-291.

Kelemen SE, Autieri MV. 2005. Expression of allograft inflammatory factor-1 in T lymphocytes: a role in T-lymphocyte activation and proliferative arteriopathies. *Am. J. Pathol.*; 167: 619-626.

Kimura, M., Kawahito, Y., Obayashi, H., Ohta, M., Hara, H., Adachi, T., Tokunaga, D., Hojo, T., Hamaguchi, M., Omoto, A., Ishino, H., Wada, M., Kohno, M., Tsubouchi, Y., Yoshikawa, T., 2007. A critical role for allograft inflammatory factor-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, 78 (5), 3316-3322.

Lorente-Cebrián, S., Decaunes, P., Dungner, E., Bouloumié, A., Arner, P., Dahlman, I., 2013. Allograft inflammatory factor 1 (AIF-1) is a new human adipokine involved in adipose inflammation in obese women. *BMC Endocr. Disord.*, 13: 54-62.

Mazur, M.A., Davis, C.C., Szabo, P., 2008. Ex vivo expansion and Th1/Tc1 maturation of umbilical cord blood T cells by CD3/CD28 costimulation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 14 (10), 1190-1196.

Monserat, J., Sánchez, M.A., de Paz, R., Díaz, D., Mur, S., Reyes, E., Prieto, A., de la Hera, A., Martínez-A, C., Alvarez-Mon, M., 2014. Distinctive patterns of naïve/memory subset distribution and cytokine expression in CD4 T lymphocytes in ZAP-70 B-chronic lymphocytic patients. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, 86 (1), 32-43.

Morohashi, T., Iwabuchi, K., Watano, K., Dashtsoodol, N., Mishima, T., Nakai, Y., Shimada, S., Nishida, R., Fujii, S., Onoé, K., 2003. Allograft inflammatory factor-1 regulates trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Immunology*, 110 (1), 112-119.

Nagakawa, Y., Nomoto, S., Kato, Y., Montgomery, R.A., Williams, G.M., Klein, A.S., Sun, Z., 2004. Over-expression of AIF-1 in liver allografts and peripheral blood

correlates with acute rejection after transplantation in rats. *Am. J. Transplant.*, 4 (12), 1949-1957.

Nikolaus, S., Schreiber, S., 2007. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 133 (5), 1670-1689.

Román, I.D., Cano-Martínez, D., Toledo-Lobo, M.V., Fernández-Moreno, M.D., Hernández-Brejjo, B., Sacristán, S., Sanmartín-Salinas, P., Monserrat, J., Gisbert, J.P., Guijarro, L.G., 2016. Infliximab therapy reverses the increase of allograft inflammatory factor-1 in serum and colonic mucosa of rats with inflammatory bowel disease. *Biomarkers*, Nov 8:1-12. [Epub ahead of print].

Schluesener, H.J., Seid, K., Meyermann, R., 1999. Effects of autoantigen and dexamethasone treatment on expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II and allograft-inflammatory factor-1 by activated macrophages and microglial cells in lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis. *Acta Neuropathol.*, 97 (2), 119-126.

Schorn, T., Drago, F., Tettamanti, G., Valvassori, R., de Eguileor, M., Vizioli, J., Grimaldi, A., 2015. Homolog of allograft inflammatory factor-1 induces macrophage migration during innate immune response in leech. *Cell Tissue Res.*, 359 (3), 853-64.

Sommerville, L.J., Kelemen, S.E., Ellison, S.P., England, R.N., Autieri, M.V., 2012. Increased atherosclerosis and vascular smooth muscle cell activation in AIF-1 transgenic mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis*, 220 (1), 45-52.

Strober, W., Fuss, I., Mannon, P., 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.*, 117 (3), 514-521.

Tian, Y., Autieri, M.V., 2007. Cytokine expression and AIF-1-mediated activation of Rac2 in vascular smooth muscle cells: a role for Rac2 in VSMC activation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 292 (2), C841-849.

Tian, Y., Jain, S., Kelemen, S.E., Autieri, M.V., 2009. AIF-1 expression regulates endothelial cell activation, signal transduction, and vasculogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 296 (2), C256-266.

Utans, U., Arceci, R.J., Yamashita, Y., Russell, M.E., 1995. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J. Clin. Invest.*, 95 (6), 2954–2962.

Watano, K., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Mitsuhashi, S., Ato, M., Kitabatake, A., Onoé, K., 2001. Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line. *Immunology*, 104 (3), 307-316.

Yang, Z.F., Ho, D.W., Lau, C.K., Lam, C.T., Lum, C.T., Poon, R.T., Fan, S.T., 2005. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. *Int. Immunol.*, 17 (11), 1391-1397.

Zen, Y., Britton, D., Mitra, V., Pike, I., Heaton, N., Quaglia, A., 2016. A global proteomic study identifies distinct pathological features of IgG4-related and primary sclerosing cholangitis. *Histopathology*, 68(6), 796-809.

Zhao YY, Huang XY, Chen ZW., 2012. Daintain/AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor-1) accelerates type 1 diabetes in NOD mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 427(3), 513-7.

Biomarkers

<u>Parameter</u>	All patients (N=23)
Sex (male/female)	13/10
Age (years)	48.9±15.7
CD (active/inactive)	13/10
Mean disease duration in years, mean ± SD (CI)	13.5±12.6 (3-56)
<u>Disease Location (CD)</u>	n (%)
L1 (ileal)	11 (47.8)
L2 (colic)	2 (8.7)
L3 (ileocolic)	10 (43.5)
<u>Behaviour (CD) (a)</u>	n (%)
B1 (non-stricturing non-penetrating)	14 (60.9)
B2 (stricturing)	7 (30.4)
B3 (penetrating)	5 (21.7)
B1+ peri-anal disease	5 (21.7)
B2+ peri-anal disease	1 (4.3)
<u>Medication</u>	n (%)
No medication	11(47.8)
Azathioprine/ 6-Mercaptopurine	6 (26.1)
Biological Therapy (anti-TNF)	6 (26.1)
<u>Surgery</u>	11 (47.8)
Ileocolic Resection	6 (26.1)
Peri-anal	5 (21.7)

Table 1.- Characteristics of the patients with Crohn's disease. CD, Crohn's disease; CI, confidence interval; (a) in accordance with Montreal classification.

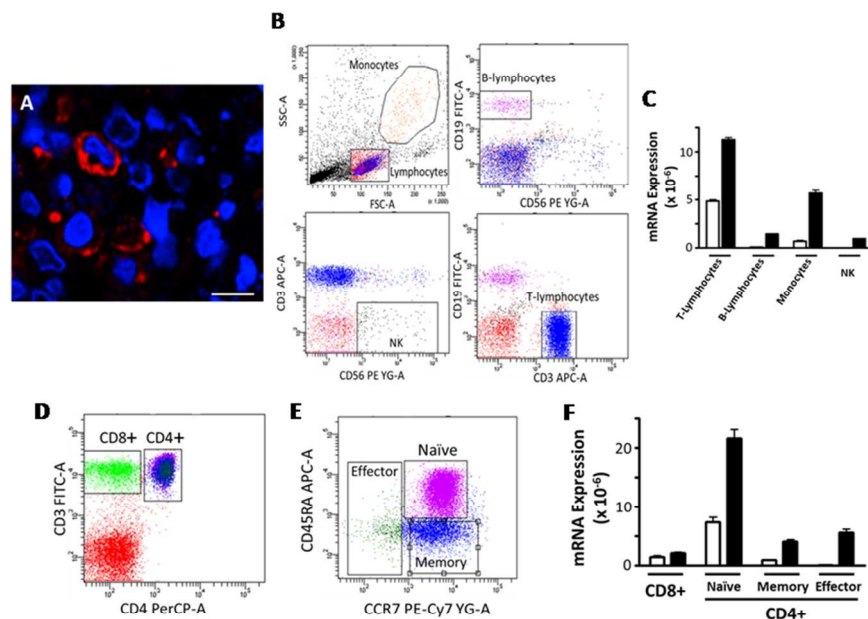


Figure 1. Cano-Martinez et al. 2016

Figure 1.- Study of AIF-1 in different types of mononuclear cells from human blood of healthy subjects. (A) Immunofluorescent identification of AIF-1 in peripheral blood mononuclear cells. (B) Isolation by FACS of monocytes, B-lymphocytes, NK and T-lymphocytes. (C) Expression of mRNA corresponding to AIF-1 in different types of mononuclear cells; isoform-1 (white columns) and isoform-2 (black columns). (D) Isolation by FACS of CD4+ and CD8+ cells. (E) Isolation by FACS of different subpopulation of CD4+ cells. (F) Expression of mRNA corresponding to AIF-1 in the different types of T- cells isolated previously; isoform-1 (white columns) and isoform-2 (black columns). Data are the mean \pm SEM of three separate experiments. Scale bar = 10 μ m.

Figure 1

254x190mm (96 x 96 DPI)

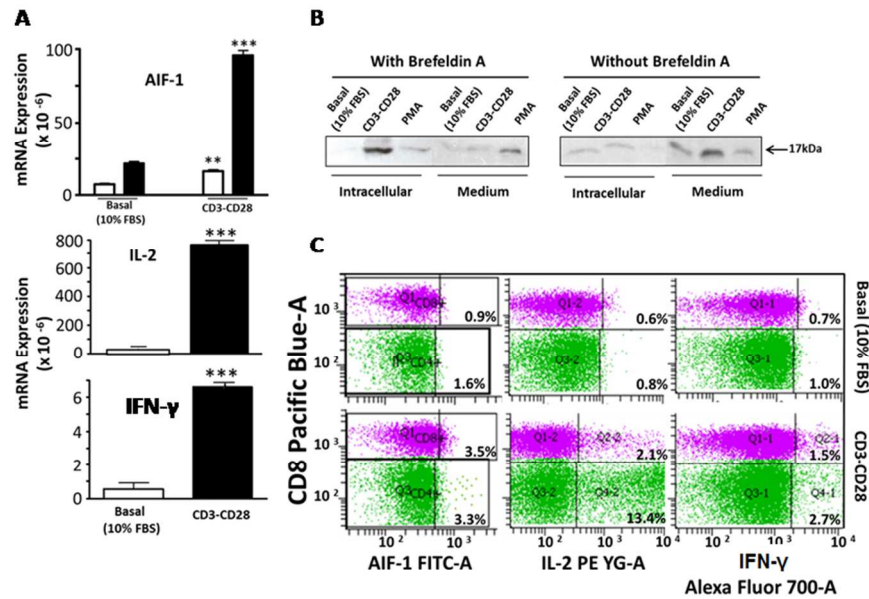


Figure 2. Cano-Martinez et al. 2016

Figure 2.- Expression of AIF-1 in human PBMCs after T-cell expansion. (A) Expression of mRNA corresponding to AIF-1, IL-2 and IFN- γ in PBMCs stimulated with Dynabeads® (CD3 and CD28) during 24 hours. Data are the mean \pm SEM of three separate experiments. Significance levels: $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***). (B) Western blot analysis of AIF-1 in the extracellular medium or in PBMCs stimulated in the above-mentioned conditions or in the presence of PMA alone. The western blot of AIF-1 represents three independent experiments. (C) Analysis by flow cytometry of intracellular AIF-1, IL-2 and IFN- γ in T-cells. After clonal expansion of PBMCs by Dynabeads® (CD3 and CD28) during 24 hours, the intracellular levels of AIF-1, IL-2 and IFN- γ were studied in CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ cells. This experiment represents three others. PMA = phorbol myristate acetate.

Figure 2

254x190mm (96 x 96 DPI)

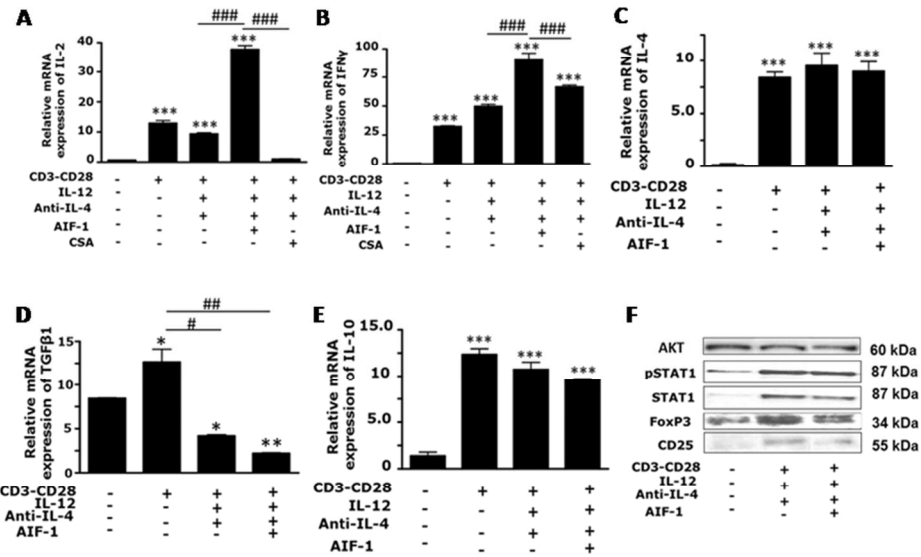


Figure 3. Cano-Martinez et al. 2016

Figure 3.- Effect of AIF-1 on T-cell differentiation. The histograms illustrate the expression of mRNA corresponding to IL-2 (A), IFN- γ (B), IL-4 (C), TGF- β (D) and IL-10 (E) in PBMCs incubated during 24 hours with FBS 10% (-) alone or FBS 10% with: Dynabeads®; Dynabeads® plus IL-12 and anti-IL-4; Dynabeads® plus IL-12, anti-IL-4 and rhAIF-1 (6 nM). (F) Analysis by western blot of biomarkers corresponding to T reg phenotype of PBMCs stimulated in the above mentioned conditions. AKT was used as a load control. The western blot showed represents three independent experiments. Significance levels: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) for comparisons with respect to control (FBS 10%); $p < 0.05$ (#); $p < 0.01$ (##), $p < 0.001$ (###) for comparisons indicated by the bar. CSA = cyclosporine A.

Figure 3
254x190mm (96 x 96 DPI)

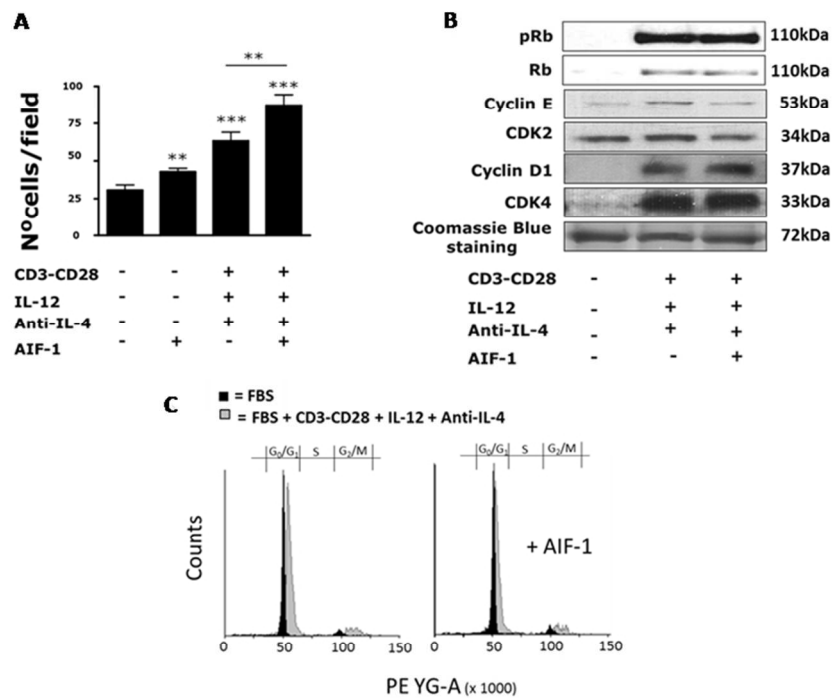


Figure 4. Cano-Martinez et al. 2016

Figure 4.- Effect of AIF-1 on PBMCs proliferation. (A) Cell counts of PBMCs incubated during 4 days with: FBS 10% (-) alone; FBS 10% plus rhAIF-1 (6nM); Dynabeads® plus IL-12 and anti-IL-4; Dynabeads® plus IL-12 and anti-IL-4 and rhAIF-1 (6 nM). Significance levels: $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***). (B) Western blot analysis of several cell cycle regulatory proteins from PBMCs incubated during 24 hours in three of the above-mentioned conditions. The western blot showed represents three independent experiments. Load control = 72 kDa band stained with Coomassie blue. (C) Cell cycle analysis of PBMCs using flow cytometry. Cells were incubated during 24 hours in the above mentioned conditions. Basal conditions (FBS 10%) correspond to black profile and in stimulated conditions (FBS 10% and Dynabeads® plus IL-12 and anti-IL-4) correspond to grey profile. Profiles on the left correspond to the absence of rhAIF-1 and profiles on the right correspond to the presence of rhAIF-1 (6 nM). This set of experiments represents three others.

Figure 4
254x190mm (96 x 96 DPI)

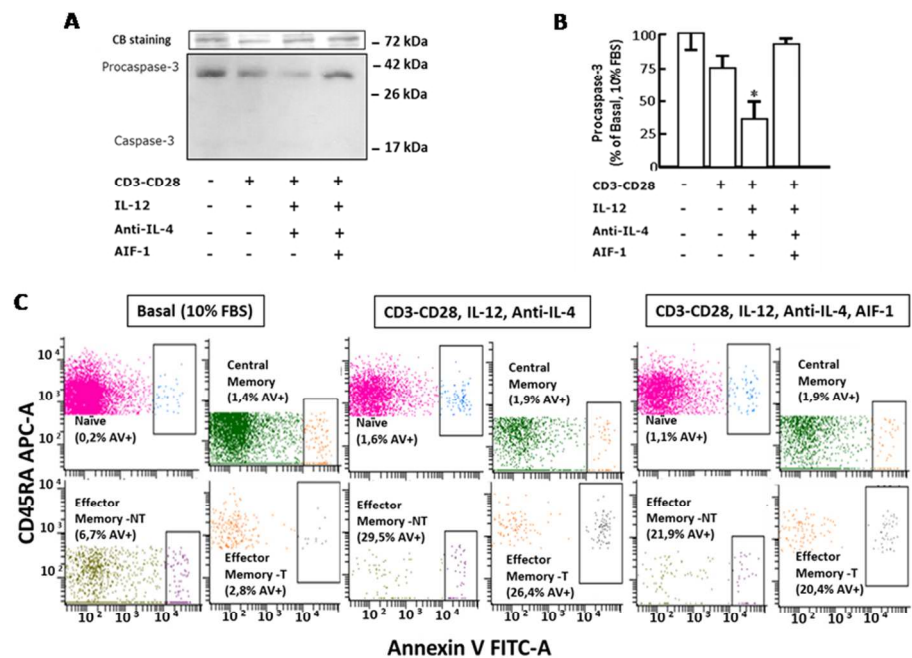


Figure 5. Cano-Martinez et al 2016

Figure 5.- Effect of AIF-1 on apoptosis. (A) Procaspase-3 degradation in PBMCs incubated during 24 hours with FBS 10% (-) alone or FBS 10% with: Dynabeads®; Dynabeads® plus IL-12 and anti-IL-4; Dynabeads® plus IL-12 and anti-IL-4 and rhAIF-1 (6 nM). Load control = 72 kDa band stained with Coomassie blue. (B) Densitometric analysis of the procaspase-3 band from the panel A using Scion Image software (n = 3). Significance levels: p < 0.05 (*). (C) Analysis of apoptosis of different T-cell subpopulations using flow cytometry after staining with Annexin V (AV+ = Annexin V positive cells) from PBMCs incubated in the above-mentioned conditions. This experiment represents three others. CB = Coomassie blue.

Figure 5
254x190mm (96 x 96 DPI)

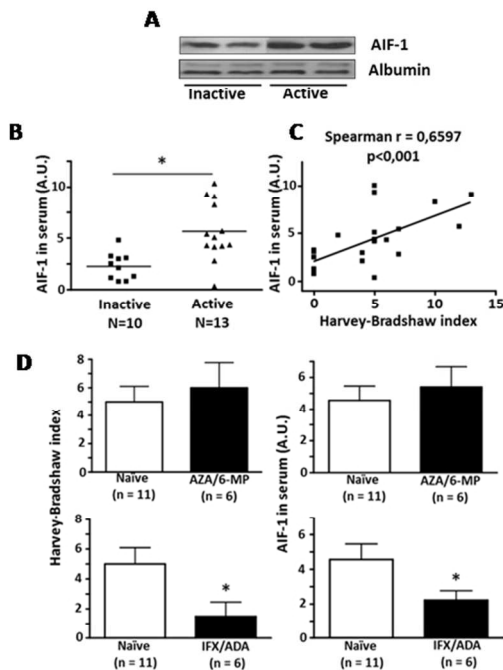


Figure 6. Cano-Martinez et al. 2016

Figure 6.- Evaluation of AIF-1 in human serum samples from CD patients. (A) Western blot analysis of AIF-1 and albumin of human serum samples. (B) Serum levels of AIF-1 from 23 patients with CD estimated by western blot and densitometric analysis using Scion Image software. (C) Correlation between AIF-1 levels in serum and Harvey-Bradshaw index of each patient. (D) Harvey-Bradshaw index and AIF-1 levels in serum of CD patients grouped by treatment. Significance levels: $p < 0.05$ (*). A.U. = arbitrary units.

Figure 6

254x190mm (96 x 96 DPI)

RESUMEN FINAL

La EII presenta fases de exacerbación de la misma, denominadas brotes, seguidas de fases de remisión en las que la enfermedad es asintomática. Clásicamente, el estado de los pacientes con EII ha sido valorado mediante parámetros clínicos como el peso corporal, la diarrea y el sangrado rectal. Sin embargo, éstos no tienen una buena correlación con la actividad de la enfermedad, en parte porque durante la fase de remisión el intestino puede tener un cierto grado de inflamación [*Pariente et al 2011*]. Hoy en día, se disponen de numerosos marcadores biológicos. No obstante distan de ser ideales. A pesar de ello, la aportación de marcadores biológicos permitiría valorar la enfermedad de manera más objetiva. Por esta razón, la presente Tesis doctoral tiene como objetivo la búsqueda de nuevos biomarcadores de la EII que permitan la estandarización de ensayos clínicos y un mejor seguimiento de la enfermedad.

En la actualidad no se dispone de ningún tratamiento curativo para la EII, por lo que los objetivos del clínico son inducir y mantener la remisión para evitar la aparición de complicaciones. En los últimos años, los anti-TNF- α , como el IFX, han modificado el curso de la enfermedad. Se ha demostrado que este grupo terapéutico promueve la cicatrización de la mucosa que actualmente es considerada el *gold standard* de la EII [*Shah et al 2016*]. Sin embargo, hay pacientes no respondedores al IFX [*Targan et al 1997*], por ello los factores asociados a la falta de respuesta a los anti-TNF- α están siendo investigados [*Vermeire et al 2002*]. Consiguientemente sería interesante la búsqueda de marcadores tempranos de buena respuesta al tratamiento.

En el capítulo I de la Tesis doctoral proponemos la mucina y el AIF-1 como marcadores histológicos de inflamación en un modelo de colitis experimental. La reducción del moco producido por las células caliciformes en la EII es un hecho constatado. Este hecho es debido a la depleción de las células que lo secretan [*Larsson et al 2011*], además, se produce una alteración de las mucinas que componen el moco como demostramos mediante inmunohistoquímica con la tinción con ácido periódico de Schiff y azul alcian. También, durante la fase de inducción de la colitis experimental observamos un aumento de células del sistema inmune infiltradas en la lamina propia del colon de ratas enfermas, sobre todo en la zona ulcerada, tal y como

anteriormente se había descrito en pacientes con EII [Brazil et al 2013]. La mayoría de estas células son positivas para AIF-1, posiblemente macrófagos y leucocitos del sistema inmune [Zhao et al 2013]. El tratamiento con IFX redujo el número células infiltradas en la lamina propia. Este hecho es explicable debido a la inducción de la apoptosis de dichas células por IFX [Eder et al 2013]. Pero una vez que se ha controlado la inflamación, es vital la recuperación de la estructura funcional del intestino, ya que durante la inflamación se produce destrucción de tejido local que conlleva a la alteración y deformación de las criptas colónicas [Jenkins et al 1997]. En este sentido, cobra importancia la pp38 del epitelio colónico. Durante la fase de inducción de la colitis experimental, fue determinada una fuerte tinción en el citoplasma de las células absortivas en el colon de ratas enfermas. Este hecho es achacable a la muerte celular [Basu et al 2014]. El IFX redujo dicha tinción en la parte alta de la cripta de Lieberkühn pero aumentó la tinción nuclear en la base de la misma, sugiriendo que el IFX promovía la diferenciación celular [Houde et al 2001].

Aunque durante la fase aguda las ratas enfermas tratadas con IFX no presentan una mejoría significativa en el peso corporal, la diarrea y el sangrado rectal, si se produjeron cambios en el colon a nivel histológico en la mucina, el AIF-1 y la pp38. Estos cambios durante la fase de inducción de la enfermedad conllevaron una mejoría del animal durante la fase de recuperación, no presentando dichos animales diarrea. Por esta razón pensamos que serían interesantes como marcadores de buen pronóstico de la EII.

Todas estas alteraciones que se producen en la EII y en el modelo de colitis desarrollado, de manera directa o indirecta están relacionadas con el sistema inmune. De sobra es conocido que en la EII se produce una activación sostenida del sistema inmune [Duchmann et al 1995], cuya consecuencia es el aumento de las especies reactivas de oxígeno producidas por células fagocíticas. Cuando la inflamación es recurrente, el organismo no es capaz de mantener el ambiente reductor dentro de la célula, y por lo tanto se produce un desequilibrio cuyo resultado es el estrés oxidativo. La EII se caracteriza por un aumento dicho estrés oxidativo [Piechota-Polanczyk & Fichna 2014]. Este acontecimiento provoca la alteración de los diferentes componentes de la célula, principalmente proteínas, lípidos y ADN. Además, nuestro grupo de

investigación describió los efectos beneficios de un antioxidante, el NAC, en pacientes con CU [Gujarro *et al* 2008].

En relación al estrés oxidativo en la EII, hemos observado que durante la colitis experimental se produce la oxidación de las proteínas colónicas, pero este hecho no se limita al colon, sino que provoca la alteración de proteínas y lípidos séricos. Además, en el capítulo II de la Tesis doctoral, determinamos que en la colitis experimental se producía la oxidación de la albúmina del suero y que el tratamiento con IFX protege de dicho evento. Debido a que encontramos una gran correlación positiva ($r=0.84$) entre los niveles de TNF- α séricos y la albúmina oxidada, sugerimos que la albúmina oxidada tiene relevancia fisiopatológica en la enfermedad. En concordancia con nuestros resultados, recientemente, Kaplan y colaboradores han descrito una correlación positiva entre los niveles de albúmina modificada y el índice de actividad de la enfermedad en pacientes con EII [Kaplan *et al* 2015]. Sin embargo, el origen de los radicales que modifican la albúmina se desconoce. Inicialmente, pensamos que son producidos por células inmunes infiltradas en la zona afectada del intestino [Weiss & LoBuglio 1982], aunque no descartamos un posible origen hepático como demuestran nuestro estudio *in vitro* con hepatocitos en condiciones proinflamatorias (TNF- α e IL-6).

A pesar del gran número de índices desarrollados que valoran la gravedad de la enfermedad, no hay ningún parámetro que tenga en cuenta el estrés oxidativo generado en la enfermedad. Ante esta situación y por las evidencias aportadas, sugerimos a la albúmina oxidada como un marcador sérico que valore el estrés oxidativo en la EII.

Como hemos relatado anteriormente, se produce un aumento de AIF-1 en el colon de ratas con colitis experimental. Previamente Mentschel y colaboradores describió este suceso en el intestino de cerdos malnutridos. Este grupo de investigación sugirió que se debía a un aumento de la presentación de antígenos procedentes del lumen intestinal [Mentschel *et al* 2002]. En consonancia con esto, nuestros resultados demuestran que durante la colitis experimental se produce una alteración de las uniones adherentes, E-cadherina y β -catenina, tal y como ocurre en pacientes con EII [Mankertz & Schulzke 2007]. Esta alteración de las uniones que mantienen unidas las

células epiteliales del colon provoca una mayor permeabilidad de la barrera intestinal y por lo tanto una mayor presentación de antígenos. Además, más tarde, Morohashi y colaboradores describieron un aumento de AIF-1 en el intestino de ratones con colitis experimental [Morohashi *et al* 2003], aunque su papel en la EII se desconoce. Sin embargo, se ha descrito un aumento de AIF-1 en diferentes patologías inflamatorias [Zhao *et al* 2013]. En este contexto, decidimos que sería de interés estudiar el papel del AIF-1 en la EII.

En el capítulo III de la Tesis doctoral determinamos que el AIF-1 aumenta tras la expansión de los linfocitos T con Dynal CD3/CD28. Esto explicaría porque se produce un aumento de AIF-1 durante la colitis experimental y en otras enfermedades inflamatorias con un componente inmune. Además, tras estimular los linfocitos T también aumentaron citocinas clásicas como la IL-2 y el IFN- γ . Por otro lado, demostramos que se comporta como una proteína de secreción ya que tras la estimulación de los linfocitos T, éstos liberan AIF-1 en el medio de cultivo. Dicha secreción es bloqueada con Brefeldina A, un inhibidor de retículo endoplásmico [Misumi *et al* 1986], aumentando en este caso el AIF-1 en el lisado de las células.

Una vez demostrado que el AIF-1 es una proteína de secreción, determinamos el AIF-1 en el suero de ratas enfermas. Estas ratas presentaron niveles más altos de AIF-1 en comparación con las ratas control. Además, el tratamiento de ratas enfermas con IFX redujo los niveles de AIF-1 sérico, similar a lo que ocurría en el colon. Por esta razón, y ya que la toma de suero es una técnica menos invasiva, decidimos valorar el AIF-1 en el suero de 47 pacientes con EII. En aquellos pacientes con la enfermedad activa en el momento de la toma de muestra presentaron niveles séricos de AIF-1 mayores comparados con los pacientes con la enfermedad asintomática.

En cuanto a la función que desempeña el AIF-1, los estudios *in vitro* realizados con PBMCs humanas demostraron que el AIF-1 potenciaba el proceso de diferenciación a Th 1. La concentración de AIF-1 utilizada de 6 nM se basó en datos previos [Fukui *et al* 2012] [Zhao *et al* 2012] [Kadoya *et al* 2014]. Al expandir los linfocitos T y diferenciarlos hacia dicho fenotipo mediante IL-12 y anti-IL-4 se observó que el AIF-1 potenciaba el proceso aumentando la producción de IL-2 e IFN- γ . Apoyando nuestros resultados, Watano y colaboradores sugieren que el AIF-1 está implicado en la respuesta Th 1, ya

que la sobreexpresión de AIF-1 en una línea celular de macrófagos hace que expresen grandes cantidades de IL-6, IL-10 e IL-12, citocinas que dirigen la respuesta Th 1 [Watano *et al* 2001]. Además, hemos demostrado que las células que presentan mayor expresión de AIF-1 son los linfocitos T CD4+. Esta subpoblación de linfocitos es clave en la respuesta adaptiva. En relación a esto, Chinnasamy y colaboradores han demostrado que el AIF-1 promueve la activación y expansión de los linfocitos T CD4+ durante la encefalomielitis experimental [Chinnasamy *et al* 2015].

Ante este contexto y en base a que la EC es una patología caracterizada por la inducción del fenotipo Th 1 [Parronchi *et al* 1997], decidimos estudiar el AIF-1 en pacientes con dicha patología.

Similar a los resultados obtenidos en el colon de ratas con colitis experimental, una serie de 4 pacientes con EC presentaron mayor cantidad de AIF-1 en biopsias de colon. La presencia de AIF-1 era mayor en las zonas ulceradas. Además, se estudió el AIF-1 sérico en 23 pacientes diagnosticados con EC. Aquellos pacientes con la enfermedad activa (índice de Harvey-Bradshaw > 4) durante la toma de suero presentaron niveles de AIF-1 significativamente mayores que los inactivos (índice de Harvey-Bradshaw ≤ 4), y se obtuvo una correlación positiva entre los niveles de AIF-1 y el índice de la enfermedad. Al estratificar los pacientes según el tratamiento, los pacientes tratados con anti-TNF- α presentaron niveles más bajos de AIF-1 que los pacientes con tratamientos clásicos. Esta bajada de los niveles de AIF-1 sugerimos que se debe a que los anti-TNF- α bloquean el TNF- α e inducen la apoptosis de células con TNF- α de membrana como las células T y los macrófagos [Atreya *et al* 2011].

Para completar el estudio del efecto del AIF-1 sobre PBMCs humanas decidimos estudiar si esta proteína tenía repercusión sobre la proliferación y/o la apoptosis durante la expansión y diferenciación del linfocito T. A pesar de encontrar un aumento en el número de células en cultivo en condiciones de expansión y diferenciación en presencia de AIF-1 no observamos un aumento de su capacidad proliferativa. Sin embargo, este aumento en el número de células se debía a que el AIF-1 aumenta la supervivencia de las células T efectoras.

En base a que el AIF-1 potencia la diferenciación del linfocito T a un fenotipo Th 1 y promueve la supervivencia de los linfocitos T efectores, unido a que es una proteína de secreción que aumentada en el suero de pacientes con EII activa, pensamos que cumple un papel en el desarrollo de la EC por lo que podría tener interés con biomarcador sérico de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. En las ratas con colitis experimental inducida por DSS tratadas con infliximab (en adelante ratas enfermas con tratamiento), se observa una disminución de la diarrea con respecto a las ratas con colitis experimental no tratadas con infliximab (en adelante ratas enfermas no tratadas).
2. El tratamiento con infliximab promueve la cicatrización de la mucosa del colon en las ratas enfermas al compararlas con las ratas enfermas no tratadas.
3. En las ratas enfermas no tratadas se observa la disminución de moco intestinal del colon y el aumento del AIF-1 en el colon, con respecto a las ratas sanas.
4. El tratamiento con infliximab de las ratas enfermas induce la recuperación del moco intestinal del colon y la disminución de AIF-1 en el colon, al comparar con las ratas enfermas no tratadas.
5. La albúmina sérica oxidada aumenta en las ratas enfermas no tratadas con respecto a las ratas sanas. El tratamiento de las ratas enfermas con infliximab revierte dicha alteración.
6. El orden de expresión de AIF-1 en células mononucleares de sangre periférica humana es: linfocitos T > monocitos > linfocitos B > NK. La subpoblación de linfocitos T CD4+ presenta mayor expresión de AIF-1 que los linfocitos T CD8+.
7. La expansión de las células T mediante las nanoesferas activadoras de CD3 y de CD28 (en adelante en condiciones de expansión del linfocito T), provoca el aumento de la expresión de AIF-1. Dicho aumento se produce tanto en el interior celular como en el exterior celular.
8. La adición exógena de AIF-1 a un cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana en condiciones de expansión del linfocito T en presencia de IL-12 y anti-IL-4 (en adelante en condiciones de expansión y

diferenciación del linfocito T al fenotipo Th 1), aumenta la producción de IFN- γ y de IL-2.

9. La adición exógena de AIF-1 a un cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana en condiciones de expansión y diferenciación del linfocito T al fenotipo Th 1, aumenta la supervivencia de las células T efectoras.
10. Los niveles séricos de AIF-1 en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) con actividad clínica objetiva están aumentados con respecto a los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal asintomática.
11. En pacientes con enfermedad de Crohn tratados con medicamentos anti-TNF- α (infliximab y adalimumab) se observa una disminución significativa de AIF-1 sérico con respecto a enfermos de Crohn no tratados con anti-TNF- α .
12. En pacientes con enfermedad de Crohn se observa una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre el índice de Harvey-Bradshaw y los niveles séricos de AIF-1.
13. Por todo ello consideramos que la albúmina sérica oxidada y el AIF-1 sérico pueden ser buenos candidatos a biomarcadores de la enfermedad inflamatoria intestinal.

ANEXO

ESTANDARIZACIÓN DEL HMSA PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-IFX. MÉTODO APLICADO EN ENFERMOS DE CROHN TRATADOS CON IFX

LA EC consiste en una inflamación crónica y transmural del tracto digestivo. En las últimas décadas la prevalencia de la EC ha aumentado anualmente. El TNF- α es una de las principales dianas farmacológicas porque está implicado en la etiología y el desarrollo de la enfermedad [Lee & Fedorak 2010]. Por ello, el bloqueo del TNF- α con anticuerpos específicos, como el IFX, es ampliamente utilizado en el tratamiento de la EC [Murdaca et al 2014]. El IFX es un anticuerpo quimérico monoclonal que bloquea de manera específica el TNF- α soluble y de membrana [Feldmann & Maini 2010] [Perrier & Rutgeerts 2011]. Sin embargo, debido a la naturaleza de este anticuerpo los pacientes tratados con IFX pueden desarrollar inmunogenicidad. Se han determinado anticuerpos anti-IFX (ATI) en pacientes con EC tratados con IFX, y se han relacionado estos anticuerpos con bajos niveles de IFX séricos, pérdida de respuesta al tratamiento y reacciones adversas tras la infusión del fármaco [Nanda et al 2013] [Lee et al 2012]. Estos efectos clínicos indeseables dependen, entre otros factores, de la concentración de ATI y de su isotipo [Steenholdt et al 2012] [Yanai & Hanauer 2011]. En la actualidad, el ELISA y el HMSA (*Homogeneous Mobility Shift Assay*) son las principales técnicas utilizadas para la detección de ATI en el laboratorio clínico. Desafortunadamente, el único estudio publicado con HMSA utiliza una mezcla de sueros obtenidos de pacientes inmunizados como curva patrón [Wang et al 2012]. Ambos métodos, el ELISA y el HMSA, no distinguen entre los diferentes isotipos de inmunoglobulinas (monoméricas IgG y IgE, diméricas IgA, y pentaméricas IgM). Debido a esto, la concentración de ATI es expresada en unidades arbitrarias. Además, en el método ELISA se producen falsos positivos por la unión inespecífica de moléculas sin identificar a la placa de ELISA [Vande Casteele et al 2012].

En este artículo se presenta un estudio prospectivo longitudinal donde fueron monitorizados durante 54 semanas 50 pacientes con EC tratados con dosis estándar de IFX (5 mg/Kg). Durante este periodo 360 muestras de suero fueron analizadas. Los niveles de ATI monomérico fueron medidos por un método

HMSA cuantitativo usando un anti-IFX de concentración conocida como calibrador. Paralelamente, los niveles de IFX séricos fueron medidos por ELISA y correlacionados con los niveles de ATI.

En el método desarrollado, a diferencia de las técnicas descritas hasta ahora, utilizamos un calibrador puro para la curva estándar que no forma polímeros con el IFX. De esta manera, estimamos el peso molecular del ATI en la cromatografía de exclusión-difusión. Gracias a ello, presentamos la concentración de ATI en nmol/L. El uso de unidades internacionales asegura la unificación de la medida a nivel mundial, permitiendo la inclusión de sistemas de estandarización en ensayos clínicos y en la práctica clínica cotidiana.

El calibrador anti-IFX permite cuantificar anticuerpos monoméricos contra IFX con un bajo límite de cuantificación (3 nM). Para clasificar la inmunogenicidad de los pacientes el límite de decisión de los niveles de ATI fue fijado en 10 nM. El 24 % (12/50) de los pacientes tratados con IFX desarrollaron ATI (10 nM) durante el periodo de observación (54 semanas). Las concentraciones séricas de ATI por encima de 10 nM incrementa de manera drástica la probabilidad de presentar bajos niveles de IFX (≤ 1.5 nM) en suero.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que usando un anticuerpo IgG puro anti-IFX para obtener la curva de calibrado, es posible cuantificar de manera precisa y específica la concentración de ATI por HMSA en unidades internacionales. Además, la concentración de ATI estimada por este método puede ayudar a predecir los cambios en la farmacocinética del IFX.



Standardization of the homogeneous mobility shift assay protocol for evaluation of anti-infliximab antibodies. Application of the method to Crohn's disease patients treated with infliximab



B. Hernández-Breijo^a, M. Chaparro^b, D. Cano-Martínez^a, I. Guerra^c, M. Iborra^d, J.L. Cabriada^e, L. Bujanda^f, C. Taxonera^g, V. García-Sánchez^h, I. Marín-Jiménezⁱ, M. Barreiro-de Acosta^j, I. Vera^k, M.D. Martín-Arranz^l, F. Mesonero^m, L. Sempereⁿ, F. Gomollón^o, J. Hinojosa^p, J.P. Gisbert^b, L.G. Guijarro^{a,*}, on behalf of the PREDICROHN study group from GETECCU

^a Systems Biology Department, Universidad de Alcalá and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Alcalá de Henares, Spain

^b Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP) and CIBEREHD, Madrid, Spain

^c Hospital de Fuenlabrada, Madrid, Spain

^d Hospital la Fe, Valencia and CIBEREHD, Spain

^e Hospital de Galdakano, Vizcaya, Spain

^f Hospital de Donostia, Guipúzcoa, Instituto Biodonostia, UPV/EHU and CIBEREHD, Spain

^g Hospital Clínico San Carlos, and IdISSC, Madrid, Spain

^h Hospital Reina Sofía, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

ⁱ Hospital Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid, Spain

^j Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

^k Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain

^l Hospital Universitario la Paz, Madrid, Spain

^m Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

ⁿ Hospital General de Alicante, Alicante, Spain

^o Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa", IIS Aragón, Zaragoza and CIBEREHD, Spain

^p Hospital de Manises, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 July 2016

Accepted 20 September 2016

Available online 21 September 2016

Keywords:

Infliximab

Anti-drug antibodies

Crohn's disease

HMSA

ABSTRACT

Background: The availability of a quantitative method to measure anti-infliximab (IFX) antibodies (ATI) would facilitate the implementation of therapeutic drug monitoring in clinical decision-making. Our aim was to standardize the homogeneous mobility shift assay (HMSA) used in the measure of ATI levels. **Methods:** In this prospective longitudinal multicenter study, 50 IFX-treated Crohn's disease (CD) patients were followed up for 54 weeks. During this period 360 human serum samples were analysed. Monomeric ATI levels were measured by a quantitative HMSA-method using an anti-IFX calibrator. IFX trough levels measured by ELISA were correlated with ATI levels.

Results: Using HMSA and a pure anti-idiotypic monoclonal antibody specific for IFX (anti-IFX calibrator), we measured the levels of monomeric ATI generated in Crohn's disease patients treated with IFX. Anti-IFX calibrator allowed to quantify monomeric antibodies against IFX with a low limit of quantification (3 nM). The threshold level of ATI in order to classify the immunogenicity of the patients was 10 nM. We observed that 24% (12/50) of IFX-treated patients developed ATI (>10 nM) during the observation period (54 weeks). Serum concentration of ATI higher than 10 nM dramatically increased the probability (OR = 51.1; 95% CI: 20.4–128.0; $p < 0.0001$) of presenting low levels of IFX (≤ 1.5 nM) in serum, as observed in some CD patients treated with standard doses of the drug.

Conclusions: The HMSA-method described here allows an accurate quantification of ATI concentration in international units (IU) and therefore it could be useful in the study of the relationship between ATI concentration, infliximab level and the clinical response to the drug.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: luis.gonzalez@uah.es (L.G. Guijarro).

1. Introduction

Crohn's disease (CD) is a chronic and transmural inflammation that may affect any part of the digestive tract [1]. In recent decades, the prevalence of CD has been increasing annually throughout the world [2]. One of the main pharmacological targets for the treatment of CD is tumour necrosis factor- α (TNF- α) because it is involved in the aetiology and development of the disease [3,4]. Therefore, blockade of TNF- α with specific antibodies like infliximab (IFX) has been widely used for the treatment of CD [4]. IFX is a monoclonal IgG antibody with high affinity for soluble and membranous forms of TNF- α [5,6]. A high percentage of CD patients treated with IFX show immunogenicity, characterized by the formation of anti-IFX antibodies (ATI), which has been associated with low IFX levels in serum, loss of response and an increased risk of infusion reactions (which have been compiled in several meta-analyses [7–9]). However, the rates of clinical remission in the presence or absence of ATI is a matter of controversy [7,8]. These undesirable clinical outcomes, including the adverse reactions after IFX treatment, depend, among other factors, on the concentration of ATI and of their isotype [10,11]. One strategy to distinguish between isotypes is the characterization of the molecular weight of ATI. However, in the only study published at present using homogeneous mobility shift assay (HMSA) [12], the molecular weight of ATI was not provided. Moreover, ATI levels were quantified in arbitrary units (U/ml) due to the absence of a pure calibrator. In the present study, we have quantified the presence of monomeric antibodies against IFX in serum of CD patients treated with IFX during a period of 54 weeks. We used for this purpose a standardized HMSA protocol. The results obtained have been correlated with serum infliximab trough levels measured by ELISA in the same patients.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The study was performed using sera from Crohn's disease patients ($n = 50$) that participated in PREDICROHN, a Spanish multicenter prospective study in which the gastroenterology units from 15 Spanish hospitals were involved. The study was conducted according to the guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Approval was obtained from the Institutional Ethics Committees of all the hospitals involved in the study. All patients signed a research authorization consent form at the time of their clinical assessment. Patients were included if they met the following criteria: over age 18; presenting luminal or perianal Crohn's disease; diagnosed by clinical, radiological, endoscopic and histological methods; requiring treatment with anti-TNF. Patients with any of the following features were excluded: pregnant or nursing women, those treated previously with other biological drugs, diagnosed with short bowel syndrome, ostomized, having undergone abdominal surgery in the last 6 months, infected with HBV (hepatitis B virus), infected with HCV (hepatitis C virus), infected with HIV (human immunodeficiency virus), or receiving anti-TNF treatment for another disease. Infliximab (5 mg/kg) was administered to patients, according to the clinical practice, at the beginning of the study (week 0), 2, 6, 14, 22, 30, 38, 46 and 54 weeks, respectively. Patient's sera were obtained at their clinical visits: at the beginning of the study (week 0), 4, 8, and just before IFX administrations at 14 and 22, 30, 38, 46 and 54 weeks. Individual serum samples from healthy controls ($n = 20$) were obtained from properly informed volunteers.

2.2. Materials

Anti-Remicade and Remicade (infliximab) were obtained from AbD Serotec (Puchheim, Germany) and Janssen Biologics B.V. (Leiden, Netherlands), respectively. Anti-Remicade is a pure IgG1 anti-idiotypic antibody generated by HUCAL (Human Combinatorial Antibody Library) technology (AbD Serotec, Puchheim, Germany; catalogue reference: HCA213). The cross-linker BS³, Alexa fluor-488 5-SDP ester and the Slide-A-Lyzer[®] G2 Dialysis Cassette were obtained from Thermo Scientific, (Rockford, IL, USA). Nitrocellulose membranes were purchased from Pall Corporation (Madrid, Spain). Bovine serum albumin (BSA), anti-human IgG (Fc specific)-peroxidase antibody, rabbit-anti human IgG-biotin, horseradish peroxidase labelled streptavidin and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Yarra 3000 column was purchased from Phenomenex (Torrance, CA, USA). TNF- α was obtained from Tebu-bio (Barcelona, Spain). Tween 20 was purchased from BioRad (Madrid, Spain). All other reagents used were of the maximal purity available.

den, Netherlands), respectively. Anti-Remicade is a pure IgG1 anti-idiotypic antibody generated by HUCAL (Human Combinatorial Antibody Library) technology (AbD Serotec, Puchheim, Germany; catalogue reference: HCA213). The cross-linker BS³, Alexa fluor-488 5-SDP ester and the Slide-A-Lyzer[®] G2 Dialysis Cassette were obtained from Thermo Scientific, (Rockford, IL, USA). Nitrocellulose membranes were purchased from Pall Corporation (Madrid, Spain). Bovine serum albumin (BSA), anti-human IgG (Fc specific)-peroxidase antibody, rabbit-anti human IgG-biotin, horseradish peroxidase labelled streptavidin and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Yarra 3000 column was purchased from Phenomenex (Torrance, CA, USA). TNF- α was obtained from Tebu-bio (Barcelona, Spain). Tween 20 was purchased from BioRad (Madrid, Spain). All other reagents used were of the maximal purity available.

2.3. Quality control of anti-Remicade (pure calibrator), Remicade (infliximab) and the assessment of the specific antigen-antibody complexes

The purity of both antibodies was assessed by SDS-PAGE, by staining with Coomassie blue and subsequent densitometric analysis. The analysis of the complex between infliximab and the calibrator was performed by western blot. Serial dilutions of anti-Remicade on PBS (pH 7.3) (Lonza, Barcelona, Spain) were incubated with 30 nM of infliximab for 1 h at room temperature. Then, the reaction mixture was cross-linked with BS3 for 30 min and quenched with TRIS (1 M, pH 7.5) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 15 min. Afterwards, samples were denatured and run on SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane; after blocking of unspecific binding sites with 5% w/v non-fat dry milk (TBS, 0.1% Tween-20), the membrane was incubated with anti-human IgG antibody coupled to horseradish peroxidase. After washing, bound antibodies were detected by the ECL detection kit (GE Lifesciences, Barcelona, Spain).

2.4. Fluorescent conjugation of infliximab (IFX-alexa 488)

Infliximab was labelled with Alexa fluor-488 5-SDP ester. Briefly, 5 mg/mL of IFX dissolved in sodium carbonate (0.1 M, pH 8.5) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was incubated (1:1) with Alexa fluor-488 5-SDP ester in the dark at 4 °C for 1 h with constant stirring. Then, the mixture was dialyzed against phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3) for 24 h using Slide-A-Lyzer[®] G2 Dialysis Cassette. Afterwards, it was purified by liquid chromatography using Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The fluorescent fractions were selected using Victor2 fluorometer (PerkinElmer, Madrid, Spain) at 494 nm. Protein concentration was measured at 280 nm using the nanoPhotometer P-class (Implen, Munich, Germany). The molar extinction coefficient of Alexa 488 at 494 nm is 73,000 M⁻¹cm⁻¹ and the labelling efficiency was calculated as follows:

$$\text{Mol dye per mol protein} = \frac{A_{494} \times \text{dilution factor}}{73,000 \times \text{protein concentration (M)}}$$

Only conjugates containing 2–3 Alexa 488 per IFX were used [12].

2.5. Size exclusion high performance chromatography (SE-HPLC)

In order to calibrate the SE-HPLC column we used different molecules with well-known molecular weight, such as thyroglobulin (Tg; 670 kDa; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), IFX (150 kDa), Fc fragment from human IgG (Fc; 55 kDa; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), TNF- α (17 kDa) and Alexa 488 (643.4 Da). These molecules

were dissolved in PBS (pH 7.3) and 50 μ L of each calibrator were injected into HPLC system. An Agilent Technologies 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, Madrid, Spain) endowed of a Yarra 3000 column was used. Effluent from HPLC was monitored by UV (λ 280 nm) or by fluorescent detection (λ_{ex} 494 nm; λ_{em} 519 nm) when IFX-alexa 488 was used. The chromatography was run with PBS (pH 7.3; Lonza, Barcelona, Spain) at a flow-rate of 0.35 mL/min for 18 min. To obtain the calibration curve, log (MW) was represented vs. the retention time (min) for each molecule.

2.6. Method of ATI measurement using SE-HPLC

To obtain the optimal conditions for the procedure, standard curves were carried out incubating a range of concentrations of anti-Remicade (3, 6, 33, 66 and 100 nM) and IFX-alexa 488 (6, 24, 48, 160 nM) in PBS. All possible combinations of both antibodies were tested at previous concentrations. In subsequent experiments IFX-alexa 488 concentration was fixed at 6 nM. With the aim of producing a standard curve to measure ATI in human serum, anti-Remicade was added to human serum from an anti-TNF-naïve patient, in the following range of concentrations: 6, 12, 24, 30, 36, 260 and 520 nM, and a fixed concentration of IFX-alexa 488 of 6 nM. The calibrator curve was obtained by representation of ATI concentrations in abscissa against the ratio B/A + B in ordinates. A = area under curve of peak of IFX-alexa 488 (retention time = 8.5 min) and B area under curve of peak of anti-remicade/IFX-alexa 488 complex (retention time = 7.5 min). We considered that MW = 150 kDa for IFX-alexa 488, for IFX and for ATI pure, in order to obtain the concentrations of ATI. To study the specificity of the interaction between infliximab and the calibrator, anti-Remicade was pre-incubated with unlabelled-IFX in a ratio of 1:2 for 1 h. Then the mixture was incubated with IFX-alexa 488 (48 nM) for another hour and injected into HPLC column.

In order to measure ATI concentrations in human serum, the samples were filtered (0.22 μ m; Merck Millipore, Madrid, Spain) and centrifuged (10,000g) for 10 min. The supernatant was used in the chromatography. Serum samples were incubated with citric acid (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) to dissociate ATI-IFX complex in cold and reversibility conditions [13,14] and decrease the interference of circulating IFX in ATI measurement. Briefly, 24 μ L of supernatant were incubated with 6 μ L of citric acid (0.5 M, pH 3.0) for 1 h at room temperature. The reaction was neutralized with 10 μ L of 10X PBS (pH 7.3). Then, the mixture was incubated with IFX-alexa 488 (6–160 nM) for another hour in the dark at room temperature. The samples were diluted 5-fold. Finally, 50 μ L of the final mixture were injected into a Yarra 3000 column (SE-HPLC column). The ATI concentration was obtained by interpolation of the ratio B/A + B in the calibrator curve obtained in presence of serum.

2.7. Determination of infliximab levels

Serum infliximab trough levels were measured by ELISA. Briefly, F96 Maxisorp plate (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) was incubated with TNF- α (0.75 μ g/mL) in carbonate-bicarbonate buffer (0.1 M, pH 9.6) overnight at 4 °C. The plate was washed four times with PBS containing 0.05% Tween 20. The unspecific binding sites were blocked by incubating them for 2 h at room temperature with 200 μ L blocking buffer (PBS containing 1% BSA). The plate was washed 4 times. Next, 100 μ L of infliximab standards (1.5–55 nM) or appropriately diluted serum samples (1:100 in 1% PBS-BSA) were added and incubated for 1 h. Afterwards, the plate was washed and incubated with rabbit-antihuman IgG-biotin (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) for 1 h. Then the plate was washed and incubated with horseradish peroxidase-labelled streptavidin

(Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) for 30 min. After washing, substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) was incubated in the dark for 1 h. Reaction was stopped by adding 1 vol of sulphuric acid (0.25 M; Panreac, Barcelona, Spain) per well. Absorbance was read at 450 nm using ELISA SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, UK). Non-specific background optical density (OD) was determined by performing the assay using wells coated with carbonate buffer alone. Optical density corresponding to background was subtracted for each determination.

2.8. Statistical analysis

We used the ANOVA test for statistical comparisons of the changes of ATI and IFX levels throughout the clinical trial and between the groups classified in function of ATI levels. The correlation between IFX levels and ATI levels was expressed using Spearman's correlation coefficient (r). We used Odds Ratio (OR) to measure the association between ATI levels (exposure) and the IFX levels (outcome). Values were reported as mean \pm SEM. The statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Patient demographics

The study population consisted of 50 anti-TNF naïve patients receiving IFX who were followed up for 54 weeks (Table 1).

3.2. Analytical validation of calibrator pure by SDS–PAGE and SE-HPLC

Manufacturer's instructions indicate for anti-infliximab (ATI pure; HCA213) (AbD Serotec, Germany) high affinity ($K_d = 3.9$ nM) and high purity grade.

These features were assessed by SDS–PAGE followed by Coomassie blue (Brilliant blue, Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) staining of IFX and ATI pure, either under reducing (plus β -mercaptoethanol; Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) or non-reducing conditions (Fig. 1A). The ability to form complexes

Table 1
Baseline characteristics of the study population.

Serum samples	360
Male number (%)	25 (50)
Age at infliximab initiation, years, median (IQR)	36.00 (28.75–50.25)
Smoking at infliximab initiation, (%)	17/50 (34)
Baseline, BMI, median (IQR), kg/m ² , (n = 49)	22.60 (21.10–25.35)
Patients ever ATI positive number (%)	12 (24)
Patients ever receiving 5-ASA_no. (%)	12 (24)
Patients ever receiving Azathioprine_no. (%)	29 (58)
Patients ever receiving Methotrexate_no. (%)	4 (8)
Patients ever receiving corticosteroids_no. (%)	16 (33)
Previous IBD-related surgery_no. (%)	25 (50)
CDAI, median (IQR)	123.00 (79.00–210.00)
Harvey-Bradshaw, median (IQR)	4.00 (2.00–7.00)
Albumin, mg/dL, median (IQR)	4.20 (3.77–4.48)
CRP, mg/dL, median (IQR)	1.30 (0.29–8.15)
Erythrocyte sedimentation rate, mm/h, median (IQR)	28.00 (11.00–37.50)
Fibrinogen, (mg/dL), median (IQR)	440.00 (360.00–506.50)
Hemoglobin, (g/dL), median (IQR)	12.85 (11.90–14.03)
Leukocytes, 10 ⁹ /L, median (IQR)	7.11 (5.55–8.33)
Neutrophils, 10 ⁹ /L, median (IQR)	4.57 (3.50–6.37)
Platelets, 10 ⁹ /L, median (IQR)	287.50 (239.00–338.50)

IQR = interquartile range; BMI = body mass index; 5-ASA = 5-aminosalicylic acid; ATI = anti-infliximab antibodies; IBD = inflammatory bowel disease; CDAI = Crohn's disease activity index; CRP = C-reactive protein.

between ATI and IFX was demonstrated incubating both proteins in the presence of BS3 (2.5 mM) and the subsequent analysis by SDS–PAGE and Coomassie blue staining. Fig. 1B shows a 300 kDa band corresponding to the binding of two monomeric immunoglobulins, even in reducing conditions (plus β -mercaptoethanol). This association was dependent on ATI concentration, and the 300 kDa band increased up to 200 nM of ATI (Fig. 1C). The Fig. 1D represents the densitometry of the 300 kDa band observed in Fig. 1C.

After identification of ATI-IFX complexes in denaturing conditions, we used SE-HPLC to confirm their formation in native conditions. ATI was diluted in PBS (pH 7.3) and then incubated with IFX-alexa 488 (48 nM) for 1 h. The mixture was injected into HPLC system provided with a Yarra 3000 column (SE-HPLC column). The immune complex of 300 kDa corresponding to the calibrator bound to IFX-alexa 488 was detected by fluorescence (Fig. 2A). The increase of ATI concentration in the incubation medium provoked a decrease of 150 kDa peak and a concomitant increase of 300 kDa peak in a dose dependent manner (Fig. 2A). The specific binding of calibrator with IFX was corroborated by pre-incubation of the calibrator (33 nM) with unlabelled-IFX (60 nM) for 30 min; afterwards, the mixture was incubated with IFX-alexa 488 (48 nM) for 1 more hour and was then injected into HPLC system. The fluorescence of the effluent was registered. The presence of ATI-IFX 488 complexes was almost completely inhibited by the pre-incubation with unlabelled IFX as shown in Fig. 2B. To quantify the molecular weight of complexes formed between immunoglobulins, the SE-HPLC column was calibrated using different molecules of known sizes (Fig. 2C).

3.3. Standard curves of ATI pure in PBS at different concentrations of IFX-alexa 488

ATI calibration curves were carried out by using different IFX-alexa 488 concentrations. Serial dilutions of calibrator (3, 6, 33, 66 and 100 nM) in PBS (pH 7.3) were incubated with different concentrations of IFX-alexa 488 (6, 24, 48 and 160 nM) in the above-mentioned conditions; afterwards, the mixtures were injected into SE-HPLC column. The sensitivity of the method, measured by the change of the ratio $B/A + B$ ($A = \text{IFX}$, $B = \text{ATI-IFX}$) with the ATI concentration, was maximal using 6 nM of IFX-alexa 488, as shown in Fig. 3A. In Fig. 3B we can see the chromatographic profiles to a fixed amount of ATI (6 nM) and increasing concentrations of IFX-alexa 488.

3.4. Standard curve of ATI pure in human serum

Sera from healthy volunteers were used to carry out the standard curve. Autofluorescence of human serum at 494 nm was studied by injection of diluted human serum into SE-HPLC column. We observed two major peaks at 5.5 min corresponding to the void volume (V_0) of the column and at 9.2 min (70 kDa) corresponding to an unknown molecule, which were not considered for ATI quantification (Fig. 4A).

Once the concentration of IFX-alexa 488 had been determined (6 nM) in previous experiments, it was employed to perform the ATI standard curve in human serum. The addition of increasing concentrations of ATI pure (6, 12, 24, 30, 36, 260 and 520 nM) to human serum was correlated with the increase of the 300 kDa peak

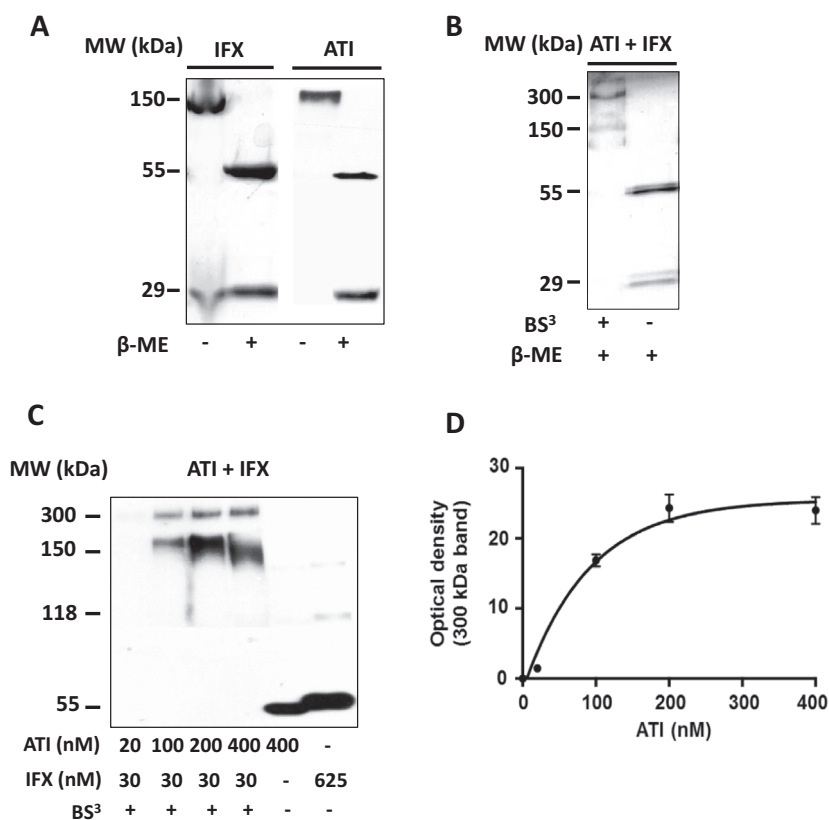


Fig. 1. Analytical validation of calibrator pure by SDS–PAGE. (A) Purity of infliximab (IFX) and anti-infliximab antibodies (ATI) was evaluated after SDS–PAGE by Coomassie blue staining. It was performed under reducing (β -mercaptoethanol, β -ME) and non-reducing conditions. (B) Binding was studied by crosslinking assay. ATI was incubated with IFX either in presence or absence of crosslinker (BS³); afterwards SDS–PAGE was developed under reducing conditions. Resulting gel was stained with Coomassie blue. (C) Increasing ATI concentrations were incubated with IFX and then BS³ was added, afterwards SDS–PAGE was developed under reducing conditions and western blot against human-IgG was carried out. (D) The 300 kDa band observed in panel C was quantified by optical densitometry (OD). All of the data shown are representative of at least three experiments.

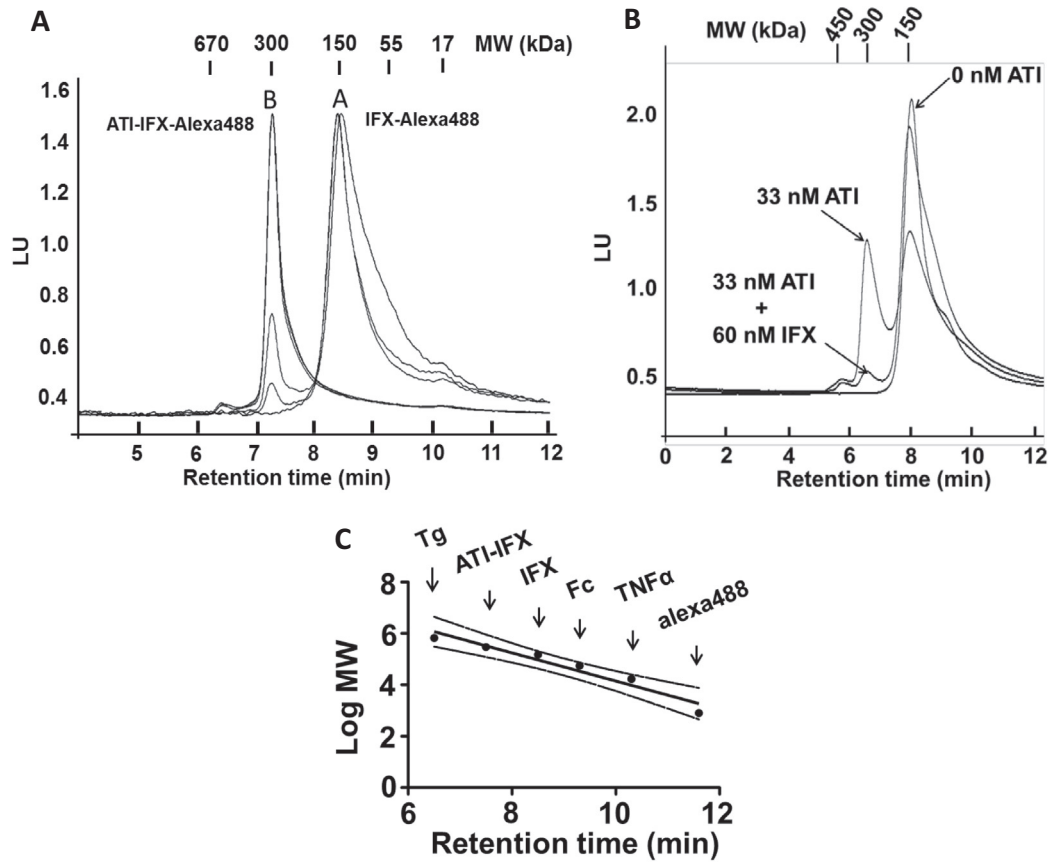


Fig. 2. Analytical validation of calibrator pure by SE-HPLC. (A) anti-infliximab antibodies (ATI) was diluted in PBS (1X) at the following concentrations (0, 2, 6, 33, 66, 100 nM) and then incubated with infliximab (IFX)-alexa 488 (48 nM) during 1 h. The mixtures were injected in the SE-HPLC column and the immune complexes were detected by fluorescence. (B) Specific binding of calibrator (33 nM) with IFX-alexa 488 (48 nM) in the absence or in the presence of unlabeled IFX (60 nM) separated by SE-HPLC and detected by fluorescence. (C) Calibration curve of SE-HPLC column using different molecules of known sizes described in Section 2.

which corresponds to ATI-IFX alexa 488 complexes, and the decrease of 150 kDa peak which corresponds to IFX alexa 488 (Fig. 4B). The arrow indicates an unidentified peak of 70 kDa which practically did not change after the addition of ATI (Fig. 4B), and that probably corresponds to autofluorescence of human serum. In the representation of the standard curve (Fig. 4C), only peak B (ATI-IFX complex) and peak A (free IFX-alexa488) were considered. The obtained calibration curve was linear in a concentration range of 6–260 nM. We arbitrarily consider 6 nM the limit of quantification of ATI (Fig. 4B).

3.5. Measurement of ATI and IFX levels in serum samples from Crohn's disease patients

Once the ATI quantification method was validated, monomeric antibodies against IFX were measured in serum samples from healthy volunteers ($n = 20$), and in serum from CD patients ($n = 50$) treated with IFX and followed up for 54 weeks in 9 clinical visits. During this period the serum samples obtained ($n = 360$) from CD patients and serum samples obtained ($n = 20$) from healthy volunteers were injected into SE-HPLC column and the fluorescence of the effluents was registered. The quotients $B/(A + B)$ obtained for each sample were interpolated on the ATI standard curve (Fig. 4C). Serum samples were diluted previously when ATI concentrations were out of linear range. Fig. 5A shows a set of typical chromatographic profiles of ATI in serum of a Crohn's disease patient treated for 30 weeks with IFX. As we can see in Fig. 5A, dur-

ing the immunization process of the patient, peak A decreased concomitantly with the increase of peak B, as had been previously observed when exogenous ATI was added to incubation medium (Fig. 4B). The results of the concentration of ATI from all serum samples ($n = 20$; healthy volunteers and $n = 360$; CD patients) were represented on a time-course graph (Fig. 5B). The non-treated subjects had 0.31 ± 0.15 nM and 0.66 ± 0.10 nM of ATI, corresponding to healthy volunteers and naïve CD patients, respectively (Fig. 5B). As expected, the values observed in naïve subjects were very low, and may be due to the binding of IFX-alexa 488 to non-identified serum proteins or to autofluorescence of human serum, or to both fluorescent signals.

We arbitrarily fixed 10 nM as the threshold to identify ATI-positive patients because none of the non-treated subjects (healthy subjects and naïve CD patients) reached this value (Fig. 5B).

After 14 weeks of treatment, 16% (8/50) of patients had over 10 nM of ATI concentration. During the 54 weeks of the study, 24% (12/50) developed ATI (Fig. 5B). The 670 kDa peaks may correspond to multimeric complexes formed by monomeric ATI when they are in excess in the incubation medium, as we have observed previously using monoclonal antibodies (data not shown). We cannot discard the presence of another isotype developed by the subjects. We observed the 670 kDa peaks in two subjects during the studied period.

In subsequent analyses only peak A (150 kDa) and peak B (300 kDa) were considered. In CD patients ($n = 50$) treated with IFX, we observed a significant increase in the ATI levels from the

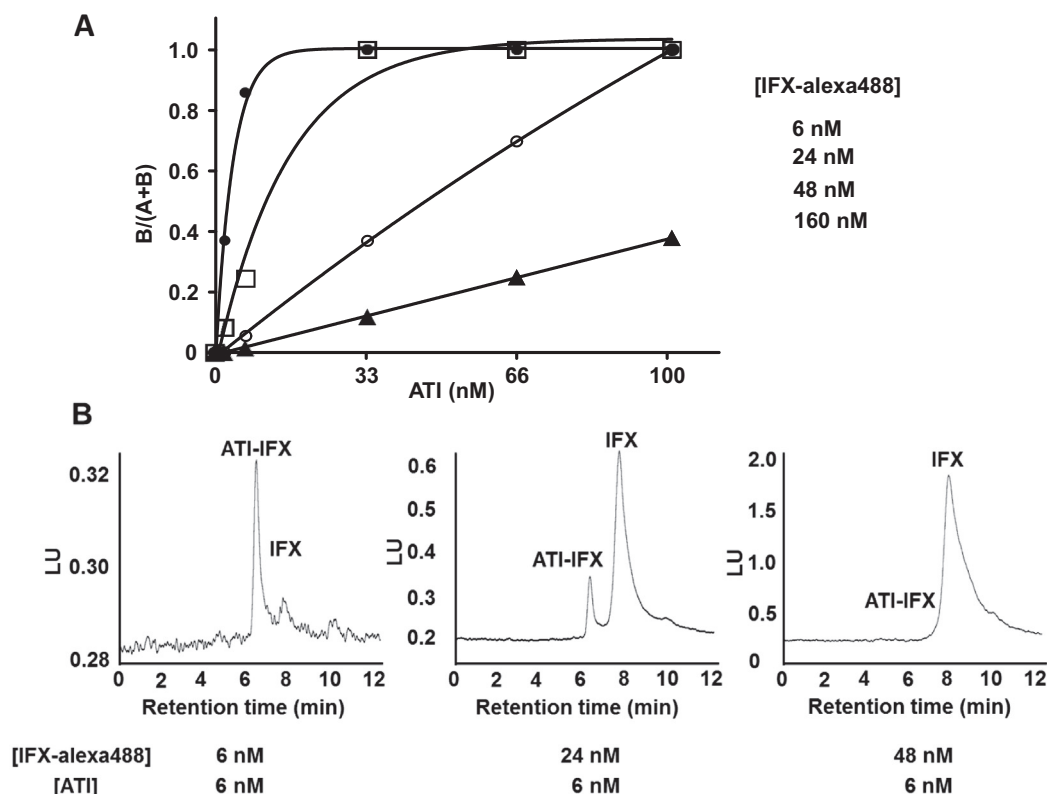


Fig. 3. Standard curves of ATI pure in PBS at different concentrations of IFX-alexa 488. (A) Anti-infliximab antibodies (ATI) was diluted in PBS (1X) to different concentrations (0, 2, 6, 33, 66, 100 nM) and then incubated with infliximab (IFX)-alexa 488 (6, 24, 48, 160 nM). After incubation, samples were injected onto HPLC column. The $B/(A + B)$ ratio was calculated from the area of peak A (retention time: 8.5 min) and peak B (retention time: 7.5 min) observed in Fig. 2A. (B) Chromatographic profiles obtained at 6 nM, 24 nM and 48 nM IFX-alexa488 concentrations and a fixed ATI concentration of 6 nM. All of the data shown are representative of at least three experiments.

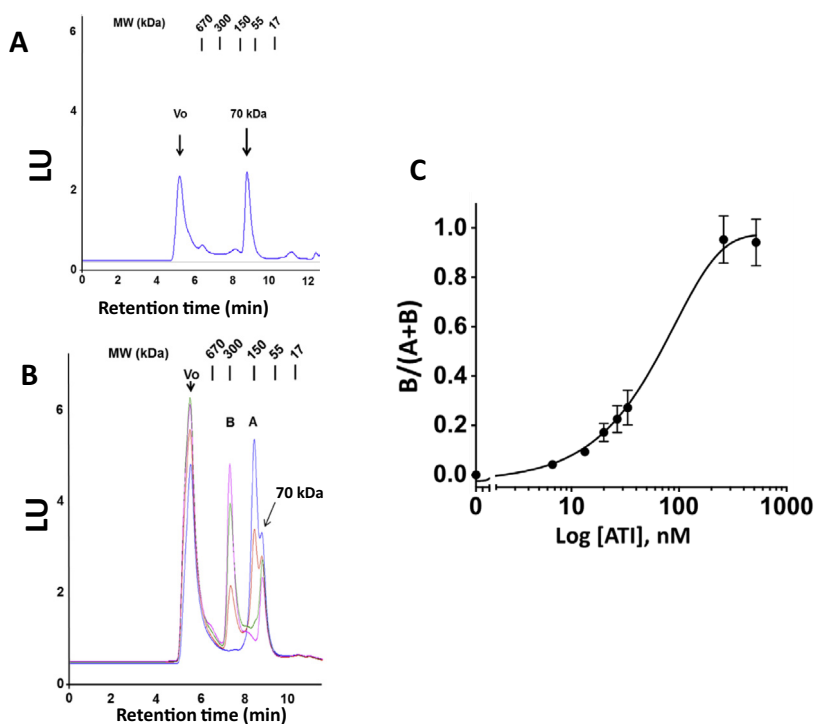


Fig. 4. Standard curve of ATI pure in human serum. (A) Diluted human serum was injected in SE-HPLC column and fluorescence at 494 nm was measured. (B) Anti-infliximab antibodies (ATI) was diluted in human serum to different concentrations (0, 6, 13, 20, 26, 33, 260, 520 nM) and then incubated with infliximab (IFX)-alexa488 (6 nM). A representative overlapped chromatogram from standard curve is shown. (C) Standard curve corresponding to ATI concentrations. The $B/(A + B)$ ratio was calculated from the area of peak A (retention time: 8.5 min) and peak B (retention time: 7.5 min) observed in Fig. 4B. All of the data shown are representative of at least three experiments.

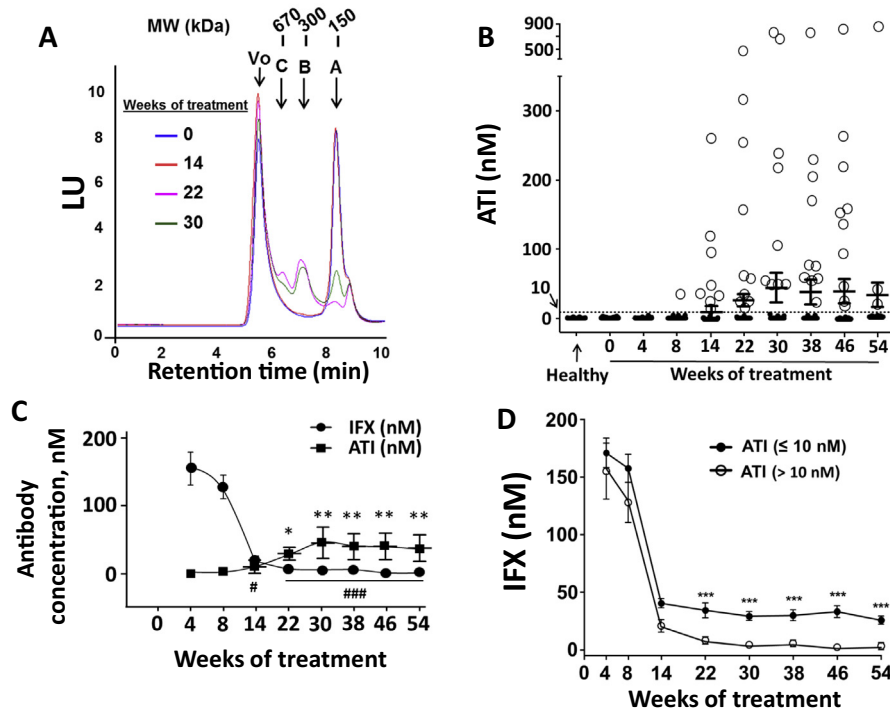


Fig. 5. Measurement of ATI and IFX trough levels in serum samples from Crohn's disease patients. (A) Overlapped chromatograms from a patient who consistently develops anti-infliximab antibodies (ATI) along the treatment were shown. (B) ATI levels measured by HMSA for each Crohn's disease (CD) patient along the study and for healthy volunteers. (C) ATI levels measured by HMSA and infliximab (IFX) trough levels measured by ELISA of CD patients. Significance levels of ATI concentration with respect to 4 weeks of treatment were: *p value < 0.05; and **p value < 0.01. Significance levels of IFX concentration with respect to 4 weeks of treatment were: #p value < 0.05; and ###p value < 0.001.

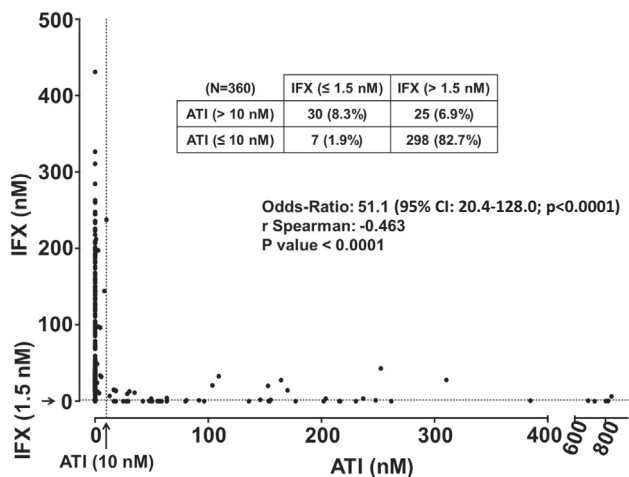


Fig. 6. Correlation between IFX and ATI levels in CD patients. Odds-Ratio and Spearman correlation between infliximab (IFX) trough levels and anti-infliximab antibodies (ATI) levels were estimated for 360 serum samples from Crohn's disease (CD) patients treated with IFX.

twenty-second week of treatment on, with respect to 4 weeks of treatment (Fig. 5C). The time-course representation of ATI and IFX levels in serum suggests that the decrease of IFX levels between 4 and 14 weeks of treatment was independent of ATI levels, whereas the subsequent decrease after 22 weeks of treatment may be dependent on ATI rise in serum (Fig. 5C). To study this aspect in greater depth, we stratified the CD patients in ATI positive (>10 nM) and negative (≤ 10 nM) before studying IFX trough levels in serum. As observed in Fig. 5D, ATI positive patients had a significant decrease in the levels of IFX in serum as compare

to ATI negative patients, being statistically significant after 22 weeks of treatment.

To deepen our understanding of these results, we correlated ATI levels with IFX trough levels (in nM units) for all the samples from CD patients. A negative correlation (r Spearman = -0.463) was found between ATI and IFX trough levels, which was statistically significant (P value < 0.0001) (Fig. 6). To estimate the mathematical probability of presenting low levels of IFX during the development of infliximab immunogenicity, we calculated the Odds Ratio (OR). Previously we established the following criteria: ATI positive (>10 nM) and negative (≤ 10 nM); undetectable (≤ 1.5 nM) or detectable (>1.5 nM) IFX trough levels. In the afore-mentioned conditions, we observed an increased risk (OR = 51.1) of presenting undetectable levels of IFX (≤ 1.5 nM) in serum of ATI positive patients with respect to ATI negative patients (Fig. 6).

4. Discussion

Antibodies to infliximab (ATI) have been associated with an increased risk of acute and severe infusion reactions and to a loss of response [7–9] in some studies of patients with inflammatory bowel disease.

Most of the side effects associated with ATI depend on their isotype, affinity and concentration of the anti-infliximab antibodies [15,16]. Reliable methods for establishing reference ranges of ATI concentrations in international units (IU) are necessary in order to: a) ensure worldwide unification of measurements; b) facilitate the interchange and comparison of data between laboratories; c) permit the inclusion of standardized systems of measure in clinical trials to avoid confusions between laboratories, among others aspects.

Currently, ELISA and HMSA are the principal techniques used for ATI detection in the clinical laboratory [12,17]. Unfortunately,

the methods described at present do not distinguish between different immunoglobulin isotypes (dimeric IgA, pentameric IgM and monomeric IgG and IgE); consequently, it is impossible to obtain their molecular weight and their concentration in international units (IU). Moreover, in the ELISA method the presence of false positives due to non-specific binding of unidentified molecules to the plate has been observed [17]. In addition, this technique shows interference by molecules that are normally found in the blood of this type of patient, such as rheumatoid factor [18]. To overcome some of these problems, the homogeneous mobility shift assay (HMSA) has been developed [12]. However, in the HMSA method, as previously described [12], the calibration curve was performed by a reference serum pool obtained from immunized patients and not with an antibody of known concentration; accordingly, the results are in arbitrary units (U/mL) [12]. Moreover, these results do not distinguish between monomeric, dimeric and pentameric antibodies [12]. In many instances, the scientific community prefers gravimetric or arbitrary units when the molecular weight or the homogeneity of the analyte is not evident. In our report, we present results on the antibody concentration in nmol/L, given that we used a calibrator pure for the standard curve. Using this method, we estimated the molecular weight of ATI in the SE-HPLC column previously calibrated. We point out that this strategy is possible because the anti-IFX that was used as a calibrator does not form polymers with IFX.

The use of IU should allow for the standardization of databases from different hospitals, especially in the measurement of antibody concentrations. Some examples of the quantification of antibodies against acetylcholine receptor [19] and voltage-gated potassium channels (VGKC) [20] illustrate that the units used in laboratory report outcomes are evolving from conventional to IU. Another crucial issue in the study of immunogenicity of IFX is obtaining reference ranges of ATI in international units. At present this task has a great difficulty because the commercially available assays use different arbitrary or gravimetric units (i.e. U/mL, AU/mL, µg/L) [17]. This is due to the lack of an available standard, needed for the calibration of each assay [17].

In the method described here we focused our attention on monomeric antibodies, as some data suggest that anti-infliximab Abs were predominantly IgG [21].

In the present paper we show that the calibrator and IFX form dimers of 300 kDa, obtained by SE-HPLC and by SDS-PAGE. The minimum concentration of ATI quantified by the present method was 3 nM, which corresponds to 0.45 µg/mL, considering MW = 150,000 Da for ATI as estimated by SE-HPLC. Although this result seems to suggest that the present method is less sensitive than previously described by Wang et al. [12], a plausible explanation is based on the selection of the chromatographic peaks for the estimation of ATI concentration. In the protocol described by Wang et al., the region of the SE-HPLC chromatographic profile used to calculate ATI concentration was not specified. In contrast, in our procedure we considered only the 300 kDa peak for ATI estimation. According to our interpretation, the probability of obtaining false positives due to pentameric antibodies coeluting in the void volume (Vo) of the column is lower. Concerning this, we have observed auto-fluorescence of human serum (in the absence of IFX-alexa 488) in the void volume (Vo) of SE-HPLC column in all serum samples studied.

Regarding the interpretative quality of our results, they have shown that the presence of ATI significantly changed the pharmacokinetic profile of IFX trough levels in CD patients treated with IFX. Although the inverse relationship between the levels of these two antibodies in CD patients has been previously reported [22], our longitudinal study delineates the time-course of immunization of CD patients. A treatment period of 22 weeks with standard doses of IFX is crucial in the development of

immunogenicity, given the significant repercussions on the IFX trough levels in CD patients.

In conclusion, our results suggest that using a pure IgG1 anti-IFX antibody to obtain the calibration curve, it is possible to accurately and specifically quantify the concentration of ATI by HMSA in SI units. In addition, ATI concentration estimated by this method may help to predict the changes in the pharmacokinetics of IFX.

Conflict of interests

*M Chaparro: has served as speaker or has received research funding from MSD, Abbvie, Takeda, and Shire Pharmaceuticals.

*I Guerra: has served as a consultant for Kern Pharma and as a speaker for Hospira.

*JL Cabriada: has served as a speaker, and advisory member for or has received research funding from MSD, Kern Pharma, Takeda, Janssen, Pfizer, Shire Pharmaceuticals and Otsuka Pharmaceutical.

*C Taxonera: has served as a speaker, a consultant and advisory member for or has received research funding from MSD, Abbvie, Pfizer, Ferring, Shire Pharmaceuticals, Dr. Falk Pharma, and Gebro Pharma and Vifor Pharma.

*V García-Sánchez: has served as a speaker, a consultant and advisory member for or has received research funding from MSD, Abbvie, Hospira, Kern Pharma, Takeda, Pfizer, Ferring, Faes Farma, Shire Pharmaceuticals, Dr. Falk Pharma, Gebro Pharma and Otsuka Pharmaceutical.

*I Marín-Jiménez: has served as a consultant, advisory member, speaker, or has received research funding from Abbvie, Chiesi, Faes Farma, Falk-Pharma, Ferring, Gebro Pharma, Hospira, Janssen, MSD, Otsuka Pharmaceutical, Pfizer, Shire, Takeda, Tillots, and UCB Pharma.

*M Barreiro-de Acosta: has served as a speaker, a consultant and advisory member for or has received research funding from MSD, Abbvie, Hospira, Kern Pharma, Takeda, Pfizer, Ferring, Faes Farma, Shire Pharmaceuticals, Dr. Falk Pharma, Chiesi, Gebro Pharma, Otsuka Pharmaceutical, and Vifor Pharma.

*I Vera: has served as a speaker, consultant and advisory member for and has received research funding from MSD, Abbvie, Pfizer, Ferring, Shire Pharmaceuticals, Takeda.

*MD Martín-Arranz: has served as a speaker for MSD, Abbvie, Takeda, Shire Pharmaceuticals, Faes and Ferring; and advisory member for MSD and Abbvie.

*L Sempere: has served as a speaker for MSD, Abbvie y Otsuka.

*F Gomollón: has served as a speaker for Abbvie, Takeda, MSD, Kern Pharma received research funding from MSD.

*J Hinojosa: has served as a speaker, a consultant and advisory member for or has received research funding from MSD, Abbvie, Hospira, Kern Pharma, Takeda, Janssen, Pfizer, Ferring, Faes Farma, Shire Pharmaceuticals, Dr. Falk Pharma, Chiesi, Gebro Pharma, Otsuka Pharmaceutical, and Vifor Pharma.

*JP Gisbert: has served as a speaker, a consultant and advisory member for or has received research funding from MSD, Abbvie, Hospira, Kern Pharma, Takeda, Janssen, Pfizer, Ferring, Faes Farma, Shire Pharmaceuticals, Dr. Falk Pharma, Chiesi, Casen Fleet, Gebro Pharma, Otsuka Pharmaceutical, and Vifor Pharma.

*B Hernández-Breijo, D Cano-Martínez, M Iborra, L Bujanda, F Mesonero, LG Guijarro: have not any financial disclosure.

Acknowledgements

Authors would like to thank both the Radioactive facility and the Chemical and Microbiological analysis Centre of the University of Alcalá for their technical help. This research has been funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS.12/02557 and

PI13/00041) and by Universidad de Alcalá (32/2013, 22/2014, 26/2015).

References

- [1] M.W. Laass, D. Roggenbuck, K. Conrad, Diagnosis and classification of Crohn's disease, *Autoimmun. Rev.* 13 (2014) 467–471.
- [2] N.A. Molodecky, I.S. Soon, D.M. Rabi, W.A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, et al., Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review, *Gastroenterology* 142 (2012) 46–54.
- [3] T.W. Lee, R.N. Fedorak, Tumor necrosis factor- α monoclonal antibodies in the treatment of inflammatory bowel disease: clinical practice pharmacology, *Gastroenterol. Clin. North Am.* 39 (2010) 543–557.
- [4] G. Murdaca, F. Spanò, M. Contatore, A. Guastalla, O. Magnani, F. Puppo, Pharmacogenetics of etanercept: role of TNF- α gene polymorphisms in improving its efficacy, *Expert Opin. Drug Metabol. Toxicol.* 10 (2014) 1703–1710.
- [5] M. Feldmann, R.N. Maini, Anti-TNF therapy, from rationale to standard of care: what lessons has it taught us? *J. Immunol.* 185 (2010) 791–794.
- [6] C. Perrier, P. Rutgeerts, Cytokine blockade in inflammatory bowel diseases, *Immunotherapy* 3 (2011) 1341–1352.
- [7] K.S. Nanda, A.S. Cheifetz, A.C. Moss, Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis, *Am. J. Gastroenterol.* 108 (2013) 40–47.
- [8] L.Y. Lee, J.D. Sanderson, P.M. Irving, Anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence, infusion reactions, immunosuppression and response, a meta-analysis, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 24 (2012) 1078–1085.
- [9] S. O'Meara, K.S. Nanda, A.C. Moss, Antibodies to infliximab and risk of infusion reactions in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis, *Inflamm. Bowel Dis.* 20 (2014) 1–6.
- [10] C. Steenholdt, M. Svenson, K. Bendtzen, O.Ø. Thomsen, J. Brynskov, M.A. Ainsworth, Acute and delayed hypersensitivity reactions to infliximab and adalimumab in a patient with Crohn's disease, *J. Crohns Colitis.* 6 (2012) 108–111.
- [11] H. Yanai, S.B. Hanauer, Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD, *Am. J. Gastroenterol.* 106 (2011) 685–698.
- [12] S.L. Wang, L. Ohrmund, S. Hauenstein, J. Salbato, R. Reddy, P. Monk, et al., Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum, *J. Immunol. Methods* 382 (2012) 177–188.
- [13] M.A. Burich, H.J. Anderson, J.P. Aubuchon, Antibody elution using citric acid, *Transfusion* 26 (1986) 116–117.
- [14] K. Bloem, A. van Leeuwen, G. Verbeek, M.T. Nurmohamed, G.J. Wolbink, D. van der Kleij, et al., Systematic comparison of drug-tolerant assays for anti-drug antibodies in a cohort of adalimumab-treated rheumatoid arthritis patients, *J. Immunol. Methods* 418 (2015) 29–38.
- [15] L. Lichtenstein, Y. Ron, S. Kivity, S. Ben-Horin, E. Israeli, G.M. Fraser, et al., Infliximab-related infusion reactions: systematic review, *J. Crohns Colitis.* 9 (2015) 806–815.
- [16] C. Steenholdt, M. Svenson, K. Bendtzen, O.O. Thomsen, J. Brynskov, M.A. Ainsworth, Severe infusion reactions to infliximab: aetiology, immunogenicity and risk factors in patients with inflammatory bowel disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34 (2011) 51–58.
- [17] N. Vande Casteele, D.J. Buurman, M.G.G. Sturkenboom, J.H. Kleibeuker, S. Vermeire, T. Rispens, et al., Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 36 (2012) 765–771.
- [18] P. Olsson, E. Theander, U. Bergström, S. Jovinge, L. Jacobsson, C. Turesson, Multiplex cytokine analyses in patients with rheumatoid arthritis require use of agents blocking heterophilic antibody activity, *Scand. J. Rheumatol.* 12 (2016) 1–10.
- [19] R.W. Paterson, M.S. Zandi, R. Armstrong, A. Vincent, J.M. Schott, Clinical relevance of positive voltage-gated potassium channel (VGKC)-complex antibodies: experience from a tertiary referral centre, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85 (2014) 625–630.
- [20] B. Ferrero, G. Aimo, R. Pagni, B. Bergamasco, M.R. Bongioanni, L. Bergamini, et al., Modified and improved anti-acetylcholine receptor (AChR) antibody assay: comparison of analytical and clinical performance with conventional anti-AChR antibody assay, *Clin. Chem.* 43 (1997) 824–831.
- [21] M. Svenson, P. Geborek, T. Saxne, K. Bendtzen, Monitoring patients treated with anti-TNF- α biopharmaceuticals: assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies, *Rheumatology (Oxford)* 46 (2007) 1828–1834.
- [22] N. Vande Casteele, R. Khanna, B.G. Levesque, L. Stitt, G.Y. Zou, S. Singh, et al., The relationship between infliximab concentrations, antibodies to infliximab and disease activity in Crohn's disease, *Gut* 64 (2015) 1539–1545.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603): 787-93.

Ahmed R, Bangham C, Cyster J, Gray D, Jankovic D, Lamm M, Lanzavecchia A, Marshall S, Mowat A, Nunez G, Oldstone M, Russell M, Sallusto F, Sansonetti P, Sher A. Dinámica de la inmunidad adaptativa: la resolución de una infección se acompaña de la muerte de casi todas las células efectoras, y la generación de células de memoria. En: Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunología de Janeway*. 7ª ed. México: McGraw-Hill; 2009. p. 441

Ahmed R (A), Bevan M, Carbone F, Heath B, Ley T, O'Garra A, Reiner S, Schreiber R, Weaver C, Colonna M. Inmunidad mediada por células T: las células T en proliferación se diferencian en células T efectoras que no requieren coestimulación para actuar. En: Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunología de Janeway*. 7ª ed. México: McGraw-Hill; 2009. p. 349

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Cell Junctions and the Extracellular Matrix. En: Alberts B. *Molecular Biology of the Cell*. 6ª ed. New York: Garland Science; 2014. p. 1035-1089.

Alonso A, Domènech E, Julià A, Panés J, García-Sánchez V, Mateu PN, Gutiérrez A, Gomollón F, Mendoza JL, Garcia-Planella E, Barreiro-de Acosta M, Muñoz F, Vera M, Saro C, Esteve M, Andreu M, Chaparro M, Manyé J, Cabré E, López-Lasanta M, Tortosa R, Gelpí JL, García-Montero AC, Bertranpetit J, Absher D, Myers RM, Marsal S, Gisbert J. Identification of Risk Loci for Crohn's Disease Phenotypes Using a Genome-Wide Association Study. *Gastroenterology*. 2015; 148(4): 794-805.

Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2001; 344: 808–14.

Annibal A, Colombo G, Milzani A, Dalle-Donne I, Fedorova M, Hoffmann R. Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015 Dec 15 [Epub ahead of print].

Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 2008; 40 Supl 2: S253-9.

Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, Waldner MJ, Atreya I, Neumann H, Hildner K, Hoffman A, Kiesslich R, Rink AD, Rau TT, Rose-John S, Kessler H, Schmidt J, Neurath MF. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14+ macrophages. *Gastroenterology*. 2011; 141(6): 2026-38.

Autieri MV. cDNA cloning of human allograft inflammatory factor-1: tissues distribution, cytokine induction, and mRNA expression in injured rat carotid arteries. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 228(1): 29-37.

Autieri MV, Carbone CM. Overexpression of allograft inflammatory factor-1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells by cell cycle deregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(9): 1421-6.

Autieri MV, Kelemen S, Thomas BA, Feller ED, Goldman BI, Eisen HJ. Allograft inflammatory factor-1 expression correlates with cardiac rejection and development of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*. 2002; 106(17): 2218-23.

Axelsson LG, Landström E, Goldschmidt TJ, Grönberg A, Bylund-Fellenius AC. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res*. 1996; 45(4): 181-91.

Basu N, Saha S, Khan I, Ramachandra SG, Visweswariah SS. Intestinal cell proliferation and senescence are regulated by receptor guanylyl cyclase C and p21. *J Biol Chem*. 2014; 289(1): 581-93.

Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E. Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *J Crohns Colitis*. 2011; 5(4): 279-86.

Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17: 423–439.

Benchimol EI, Guttman A, Griffiths AM, Rabeneck L, Mack DR, Brill H, Howard J, Guan J, To T. Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: evidence from health administrative data. *Gut*. 2009; 58: 1490–1497.

Bessissow T, Lemmens B, Ferrante M, Bisschops R, Van Steen K, Geboes K, Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P, De Hertogh G. Prognostic value of serologic and histologic markers on clinical relapse in ulcerative colitis patients with mucosal healing. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107(11): 1684-92.

Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976; 70(3): 439-44.

Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*. 2006. 24: 353–389.

Bitton A, Peppercorn MA, Antonioli DA, Niles JL, Shah S, Bousvaros A, Ransil B, Wild G, Cohen A, Edwardes MD, Stevens AC. Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2001; 120(1): 13-20.

Bjarnason I, Zanelli G, Smith T, Prouse P, Williams P, Smethurst P, Delacey G, Gumpel MJ, Levi AJ. Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology*. 1987; 93(3): 480-9.

Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17:1-5.

Brazil JC, Louis NA, Parkos CA. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19(7): 1556-65.

Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Strober W. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology*. 1999; 116(3): 557-65.

Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol*. 2002; 22(1): 1-7.

Brullet E, Bonfill X, Urrútia G, Ruiz Ochoa V, Cueto M, Clofent J, Martínez Salmerón JF, Riera J, Obrador A. Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease. *Med Clin (Barc)*. 1998; 110(17): 651-6.

Buchner AM, Lichtenstein GR. Evaluation and Detection of Dysplasia in IBD: the Role of Chromoendoscopy and Enhanced Imaging Techniques. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2016; 14(1): 73-82

Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis*. 2013; 7(4):322-37.

Card T, Logan RF, Rodrigues LC, Wheeler JG. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut*. 2004; 53: 246–250.

Carlens C, Hergens MP, Grunewald J, Ekbom A, Eklund A, Höglund CO, Askling J. Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181: 1217–22.

Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett*. 2002; 9(3): 211-23.

Chang S, Malter L, Hudesman D. Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(40): 11246-59.

Chen ZW, Ahren B, Ostenson CG, Cintra A, Bergman T, Möller C, Fuxe K, Mutt V, Jörnvall H, Efendic S. Identification, isolation, and characterization of daintain (allograft inflammatory factor 1), a macrophage polypeptide with effects on insulin secretion and abundantly present in the pancreas of prediabetic BB rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(25): 13879-84.

Chinnasamy P, Lutz SE, Riascos-Bernal DF, Jeganathan V, Casimiro I, Brosnan CF, Sibinga NE. Loss of Allograft Inflammatory Factor-1 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Limiting Encephalitogenic CD4 T-Cell Expansion. *Mol Med*. 2015; 21: 233-41.

Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, Esser D, Wang Y, Lang Y, Marano CW, Strauss R, Oddens BJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lichtenstein GR, Present D, Sands BE, Sandborn WJ. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2011. 41(4): 1194-201.

Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 17(11): 1515-27.

Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011; 140: 1785–94.

Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, Sostegni R, Rocca R, Pera A, Gevers A, Mary JY, Colombel JF, Rutgeerts P. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc.* 2004; 60(4): 505-12.

De la Morena F, Gisbert JP. Anemia y enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev Esp Enfem Dig.* 2008; 100(5): 285-93.

Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett.* 2002; 514(2-3): 115-21.

Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* 2006. 72 (9): 1102–1113.

Driscoll RH Jr, Rosenberg IH. Total parental nutrition in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am.* 1978; 62(1): 185-201.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* 1995; 102(3): 448-55.

D'Haens G, Van Deventer S, Van Hogezaand R, Chalmers D, Kothe C, Baert F, Braakman T, Schaible T, Geboes K, Rutgeerts P. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial.. *Gastroenterology.* 1999; 116(5):1029-34.

Dhouib IE, Annabi A, Jallouli M, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci.* 2016 Mar 2 [Epub ahead of print].

de Dombal FT, Softley A. IOIBD report no 1: Observer variation in calculating indices of severity and activity in Crohn's disease. International Organisation for the Study of Inflammatory Bowel Disease. Gut. 1987; 28(4): 474-81.

Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. Gastroenterology. 1991; 100(6): 1590-6.

Eder P, Lykowska-Szuber L, Krela-Kazmierczak I, Stawczyk-Eder K, Zabel M, Linke K. The influence of infliximab and adalimumab on the expression of apoptosis-related proteins in lamina propria mononuclear cells and enterocytes in Crohn's disease - an immunohistochemical study. J Crohns Colitis. 2013; 7(9): 706-16.

Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. Digestion. 2000; 62(4): 240-8.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology. 1995; 109(4): 1344-67.

Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. Mol Cell Biol. 2005; 25(21): 9350-9.

Farrokhyar F, Swarbrick ET, Irvine EJ. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2001; 36: 2–15.

Fasci-Spurio F, Aratari A, Margagnoni G, Clemente V, Moretti A, Papi C. Low bioavailability and traditional systemic steroids in IBD: can the former take over the latter? J Gastrointest Liver Dis. 2013; 22(1): 65-71.

Fausel R, Afzali A. Biologics in the management of ulcerative colitis - comparative safety and efficacy of TNF- α antagonists. *Ther Clin Risk Manag.* 2015 ; 11: 63-73.

Fefferman DS, Farrell RJ. Endoscopy in inflammatory bowel disease: indications, surveillance, and use in clinical practice. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3(1): 11-24.

Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF therapy, from rationale to standard of care: what lessons has it taught us?. *J Immunol.* 2010; 185(2): 791-4.

Fengming Y, Jianbing W. Biomarkers of inflammatory bowel disease. *Dis Markers.* 2014; 2014: 710915.

Finke D, Meier D. Molecular networks orchestrating GALT development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 308: 19-57.

Fischer A, Gluth M, Pape UF, Wiedenmann B, Theuring F, Baumgart DC. Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF- α on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013; 304(11): G970-9.

Fornaciari G, Salvarani C, Beltrami M, Macchioni P, Stockbrügger RW, Russel MG. Musculoskeletal manifestations in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol.* 2001; 15(6): 399-403.

Forthal DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr.* 2014; 2(4): 1-17.

Frøslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology.* 2007; 133(2): 412-22.

Fukui M, Tanaka M, Asano M, Yamazaki M, Hasegawa G, Imai S, Fujinami A, Ohta M, Obayashi H, Nakamura N. Serum allograft inflammatory factor-1 is a novel marker for diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012; 97(1): 146-50.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340(6): 448-54.

Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis.* 2000; 6(1): 8-15.

Gearry RB, Richardson AK, Frampton CM, Dodgshun AJ, Barclay ML. Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010; 25:325–33.

Geboes K, Dalle I. Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation. *Gut.* 2002; 50(Supl 3) III37-42.

Geboes K, Rutgeerts P, Opdenakker G, Olson A, Patel K, Wagner CL, Marano CW. Endoscopic and histologic evidence of persistent mucosal healing and correlation with clinical improvement following sustained infliximab treatment for Crohn's disease. *Curr Med Res Opin.* 2005; 21(11): 1741-54.

Gheorghe C, Pascu O, Gheorghe L, Iacob R, Dumitru E, Tantau M, Vadan R, Goldis A, Balan G, Iacob S, Dobru D, Saftoiu A. Epidemiology of inflammatory bowel disease in adults who refer to gastroenterology care in Romania: a multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 16: 1153–9.

Gionchetti P, Guarnieri C, Campieri M, Belluzzi A, Brignola C, Iannone P, Miglioli M, Barbara L. Scavenger effect of sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid, and olsalazine on superoxide radical generation. *Dig Dis Sci*. 1991; 36(2): 174-8.

Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. 2009; 361(21): 2033-45.

Gondolesi G, Ramisch D, Padin J, Almau H, Sandi M, Schelotto PB, Fernandez A, Rumbo C, Solar H. What is the normal small bowel length in humans? first donor-based cohort analysis. *Am J Transplant*. 2012; 12 Supl 4: 49-54.

Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Sanchez-Andrade A, Garcia-Porrúa C, Martín J, Gonzalez-Gay MA. Short-term adalimumab therapy improves endo-thelial function in patients with rheumatoid arthritis refractory to infliximab. *Clin Exp Rheumatol*. 2006; 24(3): 309-12.

Goyette P, Boucher G, Mallon D, Ellinghaus E, Jostins L, Huang H, Ripke S, Gusareva ES, Annese V, Hauser SL, Oksenberg JR, Thomsen I, Leslie S; International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium; Australia and New Zealand IBDGC; Belgium IBD Genetics Consortium; Italian Group for IBD Genetic Consortium; NIDDK Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium; United Kingdom IBDGC; Wellcome Trust Case Control Consortium; Quebec IBD Genetics Consortium, Daly MJ, Van Steen K, Duerr RH, Barrett JC, McGovern DP, Schumm LP, Traherne JA, Carrington MN, Kosmoliaptsis V, Karlsen TH, Franke A, Rioux JD. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nat Genet*. 2015; 47(2): 172-9.

Green C, Elliott L, Beaudoin C, Bernstein CN. A population-based ecologic study of inflammatory bowel disease: searching for etiologic clues. *Am J Epidemiol*. 2006; 164: 615–23.

Grommé M, Neefjes J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol*. 2002; 39(3-4): 181-202.

Gross V, Andus T, Leser HG, Roth M, Schölmerich J. Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases. *Klin Wochenschr*. 1991; 69(21-23): 981-7.

Guijarro LG, Mate J, Gisbert JP, Perez-Calle JL, Marin-Jimenez I, Arriaza E, Olleros T, Delgado M, Castillejo MS, Prieto-Merino D, Gonzalez Lara V, Pena AS. N-acetyl-L-cysteine combined with mesalamine in the treatment of ulcerative colitis: randomized, placebo-controlled pilot study. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(18): 2851-7.

Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*. 2002; 359(9317): 1541-9.

Hara H, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Obayashi H, Adati T. Isolation of two novel alternative splicing variants of allograft inflammatory factor-1. *Biol Chem*. 1999; 380(11): 1333-6.

Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980; 1(8167): 514.

Hildebrand H, Malmborg P, Askling J, Ekborn A, Montgomery SM. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2008; 43: 961–966.

Holtman GA, Lisman-van Leeuwen Y, Reitsma JB, Berger MY. Noninvasive Tests for Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 2016; 137(1): 1-11.

Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106: 563–73.

Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem*. 2001; 276(24): 21885-94.

Hu Y, Le Leu RK, Christophersen CT, Somashekar R, Conlon MA, Meng XQ, Winter JM, Woodman RJ, Mckinnon R, Young GP. Manipulation of the gut microbiota using resistant starch is associated with protection against colitis-associated colorectal cancer in rats. *Carcinogenesis*. 2016 Feb 19. [Epub ahead of print].

Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*. 2000; 118(4): 724-34.

Isene R, Bernklev T, Høie O, Munkholm P, Tsianos E, Stockbrügger R, Odes S, Palm Ø, Småstuen M, Moum B. Extraintestinal manifestations in Crohn's disease and ulcerative colitis: results from a prospective, population-based European inception cohort. *Scand J Gastroenterol*. 2015; 50(3): 300-5.

Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*. 2006; 116(5): 1218-22.

Iweala OI, Nagler CR. Immune privilege in the gut: the establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora. *Immunol Rev*. 2006; 213: 82-100.

Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, Theodossi A, Williams GT. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol*. 1997; 50: 93–105.

Johnston N, Jernberg T, Lindahl B, Lindbäck J, Stridsberg M, Larsson A, Venge P, Wallentin L. Biochemical indicators of cardiac and renal function in a healthy elderly population. *Clin Biochem*. 2004; 37(3): 210-6.

Jovani M, Danese S. Vedolizumab for the treatment of IBD: a selective therapeutic approach targeting pathogenic α4β7 cells. *Curr Drug Targets*. 2013; 14(12): 1433-43.

Julià A, Domènech E, Ricart E, Tortosa R, García-Sánchez V, Gisbert JP, Nos Mateu P, Gutiérrez A, Gomollón F, Mendoza JL, Garcia-Planella E, Barreiro-de Acosta M, Muñoz F, Vera M, Saro C, Esteve M, Andreu M, Alonso A, López-Lasanta M, Codó L, Gelpí JL, García-Montero AC, Bertranpetit J, Absher D, Panés J, Marsal S. A genome-wide association study on a southern European population identifies a new Crohn's disease susceptibility locus at RBX1-EP300. *Gut*. 2013; 62(10): 1440-5.

Kadoya M, Yamamoto A, Hamaguchi M, Obayashi H, Mizushima K, Ohta M, Seno T, Oda R, Fujiwara H, Kohno M, Kawahito Y. Allograft inflammatory factor-1 stimulates chemokine production and induces chemotaxis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 448(3): 287-91.

Kakazu T, Hara J, Matsumoto T, Nakamura S, Oshitani N, Arakawa T, Kitano A, Nakatani K, Kinjo F, Kuroki T. Type 1 T-helper cell predominance in granulomas of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94(8): 2149-55.

Kaplan M, Yuksel M, Ates I, Kilic ZM, Kilic H, Kuzu UB, Kayacetin E. Is ischemia modified albumin a disease activity marker for inflammatory bowel diseases?. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Dec 8 [Epub ahead of print].

Kelemen SE, Autieri MV. Expression of allograft inflammatory factor-1 in T lymphocytes: a role in T-lymphocyte activation and proliferative arteriopathies. *Am J Pathol.* 2005; 167(2): 619-26.

Keshavarzian A, Haydek J, Zabihi R, Doria M, D'Astice M, Sorenson JR. Agents capable of eliminating reactive oxygen species. Catalase, WR-2721, or Cu(II)2(3,5-DIPS)4 decrease experimental colitis. *Dig Dis Sci.* 1992; 37(12): 1866-73.

Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H, Tsuji N, Sakamaki S, Niitsu Y, Watanabe N. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem.* 2001; 47(7): 1297-301.

Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99(7): 1371-85.

Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I, Boehm D, Zielinski B, Petryszyn P, Terlecki G, Paradowski L, Gamian A. Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14(6): 794-802.

Kufer TA, Banks DJ, Philpott DJ. Innate immune sensing of microbes by Nod protein. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1072: 19–27.

Larsson JM, Karlsson H, Crespo JG, Johansson ME, Eklund L, Sjövall H, Hansson GC. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17: 2299-2307.

Lee TW, Fedorak RN. Tumor necrosis factor-a monoclonal antibodies in the treatment of inflammatory bowel disease: clinical practice pharmacology. *Gastroenterol Clin North Am.* 2010; 39(3): 543-57.

Lee LY, Sanderson JD, Irving PM. Anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence, infusion reactions, immunosuppression and response, a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 24(9): 1078-85.

Lehtinen P, Ashorn M, Iltanen S, Jauhola R, Jauhonen P, Kolho KL, Auvinen A. Incidence trends of pediatric inflammatory bowel disease in Finland, 1987–2003, a nationwide study. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011. 17(8): 1778-83.

Lim PS, Jeng Y, Wu MY, Pai MA, Wu TK, Liu CS, Chen CH, Kuo YC, Chien SW, Chen HP. Serum oxidized albumin and cardiovascular mortality in normoalbuminemic hemodialysis patients: a cohort study. *PLoS One*. 2013; 8(7): e70822.

Liu S, Tan WY, Chen QR, Chen XP, Fu K, Zhao YY, Chen ZW. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF-kappaB/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth. *Cancer Sci*. 2008; 99(5): 952-7.

Logan I, **Bowlus CL**. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. *Autoimmun Rev*. 2010; 9(5): A372–A378.

Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 1462–71.

Mankertz J, **Schulzke JD**. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007; 23(4): 379-83.

Mantzaris GJ. Anti-TNFs: Originators and Biosimilars. *Dig Dis*. 2016; 34(1-2): 132-139.

Market E, **Papavasiliou FN**. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol*. 2003; 1(1): E16.

Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). Gut. 1989; 30(7): 983-9.

Mazzuoli S, Guglielmi FW, Antonelli E, Salemme M, Bassotti G, Villanacci V. Definition and evaluation of mucosal healing in clinical practice. Dig Liver Dis. 2013; 45(12): 969-77.

McDaniel DO, Rigney DA, McDaniel KY, Windham WJ, Redmond P, Williams B, Zhou X, Hawxby A, Butt F. Early expression profile of inflammatory markers and kidney allograft status. Transplant Proc. 2013; 45(4): 1520-3.

McPherson RA. Specific proteins. In: McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p.253-66.

Mendoza JL, Abreu MT. Biological markers in inflammatory bowel disease: practical consideration for clinicians. Gastroenterol Clin Biol. 2009; 33 (Supl 3) S158–173.

Mentschel J, Deininger MH, Schluesener HJ, Claus R. Effects of malnutrition on the expression of daintain/AIF-1 in the gut mucosa of pigs. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2002; 49(4): 184-8.

Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Tomita K, Otagiri M. Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible involvement in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. Hypertens Res. 2005; 28(12): 973-80.

Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. J Biol Chem. 1986; 261(24): 11398-403.

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol.* 2001; 101(3): 249-55.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012; 142: 46–54.

Moore L, Dally AF, Agur AMR. Abdomen. En: Gotzëns V. *Anatomía con orientación clínica.* 6ª ed. Barcelona: Lippincott Williams & Wilkins. 2010. p.243.

Moran A, Jones A, Asquith P. Laboratory markers of colonoscopic activity in ulcerative colitis and Crohn's colitis. *Scand J Gastroenterol.* 1995; 30(4): 356-60.

Morohashi T, Iwabuchi K, Watano K, Dashtsoodol N, Mishima T, Nakai Y, Shimada S, Nishida R, Fujii S, Onoé K. Allograft inflammatory factor-1 regulates trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Immunology.* 2003; 110(1): 112-9.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 1989; 96(3): 795-803.

Murdaca G, Spanò F, Contatore M, Guastalla A, Magnani O, Puppo F. Pharmacogenetics of etanercept: role of TNF- α gene polymorphisms in improving its efficacy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014; 10(12): 1703-10.

Muro M, López-Hernández R, Mrowiec A. Immunogenetic biomarkers in inflammatory bowel diseases: role of the IBD3 region. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(41): 15037-48.

Musch MW, Bookstein C, Xie Y, Sellin JH, Chang EB. SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280(4): G687-93.

Nagakawa Y, Nomoto S, Kato Y, Montgomery RA, Williams GM, Klein AS, Sun Z. Over-expression of AIF-1 in liver allografts and peripheral blood correlates with acute rejection after transplantation in rats. *Am J Transplant*. 2004; 4(12): 1949-57.

Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2013; 108(1): 40-7.

Nerich V, Monnet E, Etienne A, Louafi S, Ramée C, Rican S, Weill A, Vallier N, Vanbockstael V, Auleley GR, Allemand H, Carbonnel F. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12: 218–26.

Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995; 182(5): 1281-90.

Ng SC. Epidemiology of inflammatory bowel disease: focus on Asia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014; 28(3): 363-72.

Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH, Lakatos PL, Loftus EV Jr, Tysk C, O'Morain C, Moum B, Colombel JF. Geographical Variability and Environmental Risk Factors in Inflammatory Bowel Disease. *Gut*. 2013; 62(4): 630-649.

Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, Putz-Bankuti C, Krisper P, Graziadei I, Vogel W, Lackner C, Stauber RE. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol*. 2013; 59(5): 978-83.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990; 98(3): 694-702.

Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002; 17(10): 1078-83.

O'Keefe SJ. Nutrition and Gastrointestinal disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996; 220: 52-9.

Olsen T, Rismo R, Cui G, Goll R, Christiansen I, Florholmen J. TH1 and TH17 interactions in untreated inflamed mucosa of inflammatory bowel disease, and their potential to mediate the inflammation. *Cytokine*. 2011; 56(3): 633-40.

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991; 324(2): 84-8.

Orsmark C, Skoog T, Jeskanen L, Kere J, Saarialho-Kere U. Expression of allograft inflammatory factor-1 in inflammatory skin disorders. *Acta Derm Venereol*. 2007; 87(3): 223-7.

Pallone F, Monteleone G. Interleukin 12 and Th1 responses in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998; 43(6): 735-6.

Palomino-Morales RJ, Oliver J, Gómez-García M, López-Nevot MA, Rodrigo L, Nieto A, Alizadeh BZ, Martín J. Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease: a meta-analysis approach. *Genes Immun*. 2009; 10(4): 356-64.

Pariente B, Cosnes J, Danese S, Sandborn WJ, Lewin M, Fletcher JG, Chowers Y, D'Haens G, Feagan BG, Hibi T, Hommes DW, Irvine EJ, Kamm MA, Loftus EV Jr, Louis E, Michetti P, Munkholm P, Oresland T, Panés J, Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Sands BE, Schoelmerich J, Schreiber S, Tilg H, Travis S, van Assche G, Vecchi M, Mary JY, Colombel JF, Lémann M. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(6): 1415-22.

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*. 1997; 150(3): 823-32.

Pashenkov M, Efendic S, Zhu J, Zou LP, Ostenson CG, Mustafa M. Augmented expression of daintain/allograft inflammatory factor-1 is associated with clinical disease: dynamics of daintain/allograft inflammatory factor-1 expression in spleen, peripheral nerves and sera during experimental autoimmune neuritis. *Scand J Immunol*. 2000; 52(2): 117-22.

Pawlik A, Kotrych D, Paczkowska E, Roginska D, Dziedziejko V, Safranow K, Machalinski B. Expression of allograft inflammatory factor-1 in peripheral blood monocytes and synovial membranes in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2016; 77(1): 131-6.

Peake ST, Bernardo D, Mann ER, Al-Hassi HO, Knight SC, Hart AL. Mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor alpha agents in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19(7): 1546-55.

Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96(3): 730-4.

Perrier C, Rutgeerts P. Cytokine blockade in inflammatory bowel diseases. *Immunotherapy*. 2011; 3(11): 1341-52

Perrotta C, Pellegrino P, Moroni E, De Palma C, Cervia D, Danelli P, Clementi E. Five-aminosalicylic Acid: an update for the reappraisal of an old drug. *Gastroenterol Res Pract*. 2015; 2015: 456895.

Peyrin-Biroulet L. Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2010; 56(2): 233-43.

Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; 14(3-4): 185-91.

Piechota-Polanczyk A, Fichna J. The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2014; 387(7): 605-20.

Postler E, Rimner A, Beschoner R, Schluesener HJ, Meyermann R. Allograft-inflammatory-factor-1 is upregulated in microglial cells in human cerebral infarctions. *J Neuroimmunol*. 2000; 108(1-2): 244-50.

Quaglietta L, te Velde A, Staiano A, Troncone R, Hommes DW. Functional consequences of NOD2/CARD15 mutations in Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007; 44(5): 529-39.

Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ*. 1989; 298: 82–6.

Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, Green A, Newman B, Florin TH. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2002; 51(6): 808-13.

Radford-Smith G, Pandeya N. Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease--Are we there yet?. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(44): 7097-103.

Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?. *Dig Dis Sci.* 2007; 52(9): 2015-21.

Richter F, Richter A, Yang K, Lipkin M. Cell proliferation in rat colon measured with bromodeoxyuridine, proliferating cell nuclear antigen, and [3H]thymidine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992; 1(7): 561-6.

Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, Frommel TO, Winship DH, Holmes EW. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem.* 1999; 266(1): 48-57.

Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008; 582(13): 1783-7.

Ros LH, Crespo AM, Giménez F, Marcuello T, Galbe R. Diagnostic imaging of inflammatory bowel disease. *Radiología.* 2006; 48(4): 205-15

Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JI. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology.* 1989; 96(4): 1016-20.

Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(30): 4819-3.

Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1990; 99(4): 956-63.

Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Kerremans R, Coenegrachts JL, Coremans G. Natural history of recurrent Crohn's disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery. *Gut*. 1984; 25(6): 665-72.

Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005; 353(23): 2462-76.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005; 6(4): 345-52.

Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2009; 137(5): 1736-45.

Sandborn WJ, Melmed GY, McGovern DP, Loftus EV Jr, Choi JM, Cho JH, Abraham B, Gutierrez A, Lichtenstein G, Lee SD, Randall CW, Schwartz DA, Regueiro M, Siegel CA, Spearman M, Kosutic G, Pierre-Louis B, Coarse J, Schreiber S. Clinical and demographic characteristics predictive of treatment outcomes for certolizumab pegol in moderate to severe Crohn's disease: analyses from the 7-year PRECiSE 3 study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015; 42(3): 330-42.

Sartor RB. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006; 3(7): 390-407.

Saverymuttu SH, Hodgson HJ, Chadwick VS, Pepys MB. Differing acute phase responses in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 1986; 27(7): 809-13.

Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*. 2007; 282(28): 20059-63.

Schluesener HJ, Seid K, Meyermann R. Effects of autoantigen and dexamethasone treatment on expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II and allograft-inflammatory factor-1 by activated macrophages and microglial cells in lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis. *Acta Neuropathol.* 1999; 97(2): 119-26.

Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med.* 1987; 317(26): 1625-9.

Selby WS, Griffin S, Abraham N, Solomon MJ. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis but does not affect its course. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(11): 2834-8.

Seo M, Okada M, Yao T, Ueki M, Arima S, Okumura M. An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 1992; 87(8): 971-6.

Shah SC, Colombel JF, Sands BE, Narula N. Mucosal Healing Is Associated With Improved Long-term Outcomes of Patients With Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016 Jan 30 [Epub ahead of print].

Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet.* 2002 J; 359(9300): 62-9.

Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut.* 1996; 39: 690-7.

Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV Jr, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005; 19 Supl A: 5A-36A.

Simon EG, Ghosh S, Iacucci M, Moran GW. Ustekinumab for the treatment of Crohn's disease: can it find its niche?. *Therap Adv Gastroenterol*. 2016; 9(1): 26-36.

Smith LA, Gaya DR. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2012; 18 (46): 6782-9.

Smith LA, Rameshanker R, Healy J. An unusual prevalence of inflammatory bowel disease in a multiethnic population-single centre UK data. *Gut*. 2010; 59 supl 3: A181.

Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW, Kaplan GG. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2012; 12: 51.

Standring S. Large intestine. En: Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40ª ed. España: Elsevier. 2008. p. 1137-1162

Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Schölmerich J, Reinisch W. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*. 2006; 55 Supl 1: i1-15.

Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, Feakins R, Fléjou JF, Herfarth H, Hommes DW, Kupcinskas L, Lakatos PL, Mantzaris GJ, Schreiber S, Villanacci V, Warren BF. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2008; 2(1): 1-23.

Steenholdt C, Svenson M, Bendtzen K, Thomsen OØ, Brynskov J, Ainsworth MA. Acute and delayed hypersensitivity reactions to infliximab and adalimumab in a patient with Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2012; 6(1): 108-11.

Stejskal D, Lacnák B, Juráková R, Adamovská S, Prosková J, Ochmanová R, Ozanová G. First experience with the cobalt binding capacity (ACB) test in the diagnosis of acute coronary syndrome (a pilot study). *Vnitr Lek*. 2004; 50(10): 734-9.

Storch MK, Weissert R, Steffer A, Birnbacher R, Wallström E, Dahlman I, Ostensson CG, Linington C, Olsson T, Lassmann H. MHC gene related effects on microglia and macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis determine the extent of axonal injury. *Brain Pathol*. 2002; 12(3): 287-99.

Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol*. 2006. 6(1): 9–20.

Su CG, Judge TA, Lichtenstein GR. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2002; 31(1): 307-27.

Swain SL, Mckinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12(2): 136–148.

Takahashi T, Terada T, Arikawa H, Kizaki K, Terawaki H, Imai H, Itoh Y, Era S.. Quantitation of Oxidative Modifications of Commercial Human Albumin for Clinical Use: Thiol Oxidation and Carbonylation. *Biol Pharm Bull*. 2016; 39(3): 401-8.

Talley NJ, Abreu MT, Achkar JP, Bernstein CN, Dubinsky MC, Hanauer SB, Kane SV, Sandborn WJ, Ullman TA, Moayyedi P. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106 Supl 1:S2-25.

Tamboli C, Cortot A, Colombel J. What are the major arguments in favour of the genetic susceptibility for inflammatory bowel disease?. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003; 15(6): 587-92.

Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med*. 1997; 337(15): 1029-35.

Ternant D, Mulleman D, Degenne D, Willot S, Guillaumin JM, Watier H, Goupille P, Paintaud G. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit*. 2006; 28(2): 169-74.

Thomas RD, Westengard JC, Hay KL, Bull BS. Calibration and validation for erythrocyte sedimentation tests. Role of the International Committee on Standardization in Hematology reference procedure. *Arch Pathol Lab Med*. 1993; 117(7): 719-23.

Tian Y, Kelemen SE, Autieri MV. Inhibition of AIF-1 expression by constitutive siRNA expression reduces macrophage migration, proliferation, and signal transduction initiated by atherogenic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 290(4): C1083-91.

Travis SP, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel JF, Feagan BG, Hanauer SB, Lémann M, Lichtenstein GR, Marteau PR, Reinisch W, Sands BE, Yacyshyn BR, Bernhardt CA, Mary JY, Sandborn WJ. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut*. 2012; 61(4): 535-42.

Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J.* 1955; 2(4947): 1041-8.

Toedter G, Li K, Sague S, Ma K, Marano C, Macoritto M, Park J, Deehan R, Matthews A, Wu GD, Lewis JD, Arijs I, Rutgeerts P, Baribaud F. Genes associated with intestinal permeability in ulcerative colitis: changes in expression following infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18(8): 1399-410.

Tytgat KM, Büller HA, Opdam FJ, Kim YS, Einerhand AW, Dekker J. Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. *Gastroenterology.* 1994; 107(5): 1352-63.

Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest.* 1995; 95(6): 2954-62.

Vande Casteele N, Buurman DJ, Sturkenboom MG, Kleibeuker JH, Vermeire S, Rispens T, van der Kleij D, Gils A, Dijkstra G. Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 36(8): 765-71.

Van der Sluys Veer A, Biemond I, Verspaget HW, Lamers CB. Faecal parameters in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1999; 230: 106-10.

Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21: 1982-92.

Velázquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci.* 1996; 41(4): 727-39.

Veloso FT. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: do they influence treatment and outcome? *World J Gastroenterol.* 2011; 17(22): 2702-7.

Vermeire S, Louis E, Carbonez A, Van Assche G, Noman M, Belaiche J, De Vos M, Van Gossum A, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Reynaert H, D'Haens G, Rutgeerts P. Demographic and clinical parameters influencing the short-term outcome of anti-tumor necrosis factor (infliximab) treatment in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(9): 2357-63.

Vermeire S, O'Byrne S, Keir M, Williams M, Lu TT, Mansfield JC, Lamb CA, Feagan BG, Panes J, Salas A, Baumgart DC, Schreiber S, Dotan I, Sandborn WJ, Tew GW, Luca D, Tang MT, Diehl L, Eastham-Anderson J, De Hertogh G, Perrier C, Egen JG, Kirby JA, van Assche G, Rutgeerts P. Etrolizumab as induction therapy for ulcerative colitis: a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2014; 384(9940): 309-18.

Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease.. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10(5): 661-5.

Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?. *Gut.* 2006; 55(3): 426-31.

Villadangos JA. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol.* 2001; 38(5): 329-46.

Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(1): 6-21.

Wang SL, Ohrmund L, Hauenstein S, Salbato J, Reddy R, Monk P, Lockton S, Ling N, Singh S. Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum. *J Immunol Methods.* 2012; 382(1-2): 177-88.

Wang K, Zhang H, Kugathasan S, Annese V, Bradfield JP, Russell RK, Sleiman PM, Imielinski M, Glessner J, Hou C, Wilson DC, Walters T, Kim C, Frackelton EC, Lionetti P, Barabino A, Van Limbergen J, Guthery S, Denson L, Piccoli D, Li M, Dubinsky M, Silverberg M, Griffiths A, Grant SF, Satsangi J, Baldassano R, Hakonarson H. Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn Disease. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 399 – 405.

Wang J, Zhao Y, Wang W, Du Z, Yan D, Li C, Chen Z. Daintain/AIF-1 plays roles in coronary heart disease via affecting the blood composition and promoting macrophage uptake and foam cell formation. *Cell Physiol Biochem*. 2013; 32(1): 121-6.

Watano K, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Mitsuhashi S, Ato M, Kitabatake A, Onoé K. Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line. *Immunology*. 2001; 104(3): 307-16.

Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest*. 1982; 47(1): 5-18.

Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*. 2015; 264(1): 182-203.

Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Epidemiological characteristics of inflammatory bowel disease in North-Eastern Poland. *World J Gastroenterol* 2005; 11:2630–3.

Wilson J, Hair C, Knight R, Catto-Smith A, Bell S, Kamm M, Desmond P, McNeil J, Connell W. High incidence of inflammatory bowel disease in Australia: a prospective populationbased Australian incidence study. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16: 1550–6.

Wilson A, Reyes E, Ofman J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature. *Am J Med.* 2004; 116: 44S–9S

Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc.* 2007; 2(3): 541-6.

Wu AHB. The ischemia-modified albumin biomarker for myocardial ischemia. *MLO Med Lab Obs.* 2003; 35(6): 36-8, 40.

Wu P, Xie F, Xue M, Xu X, He S, Lin M, Bai L. Advanced oxidation protein products decrease the expression of calcium transport channels in small intestinal epithelium via the p44/42 MAPK signaling pathway. *Eur J Cell Biol.* 2015; 94(5): 190-203.

Xiao B, Laroui H, Ayyadurai S, Viennois E, Charania MA, Zhang Y, Merlin D. Mannosylated bio-reducible nanoparticle-mediated macrophage-specific TNF- α RNA interference for IBD therapy. *Biomaterials.* 2013; 34(30): 7471-82.

Yanai H, Hanauer SB. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106(4): 685-98.

Yang ZF, Ho DW, Lau CK, Lam CT, Lum CT, Poon RT, Fan ST. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. *Int Immunol.* 2005; 17(11): 1391-7.

Yang SK, Loftus EV, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm Bowel Dis.* 2001; 7: 260–270.

Ye Y, Miao S, Lu R, Xia X, Chen Y, Zhang J, Wu X, He S, Qiang F, Zhou J. Allograft inflammatory factor-1 is an independent prognostic indicator that regulates β -catenin in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2014; 31(2): 828-34.

Zhao YY, Huang XY, Chen ZW. Daintain/AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor-1) accelerates type 1 diabetes in NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 427(3): 513-7.

Zhao YY, Yan DJ, Chen ZW. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. *Cell Immunol.* 2013; 284(1-2): 75-83.

Zhou XL, Xu W, Tang XX, Luo LS, Tu JF, Zhang CJ, Xu X, Wu QD, Pan WS. Fecal lactoferrin in discriminating inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome: a diagnostic meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14: 121.

Zlonis M. The mystique of the erythrocyte sedimentation rate. A reappraisal of one of the oldest laboratory tests still in use. *Clin Lab Med.* 1993; 13(4): 787-800.

Página web:

Atlas de histología vegetal y animal [sede Web]. Vigo: Universidad de Vigo; 2008 [actualizado 22 de diciembre de 2014; acceso 14 de abril de 2016]. Intestino delgado [aproximadamente 5]. <http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-delgado.php>